

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAULO ROBERTO DANTAS MARANGONI

FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM USINAS HIDRELÉTRICAS, SEUS EFEITOS E O  
CONTROLE DA CORROSÃO INFLUENCIADA POR MICRO-ORGANISMOS

Curitiba  
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM USINAS HIDRELÉTRICAS, SEUS EFEITOS E O  
CONTROLE DA CORROSÃO INFLUENCIADA POR MICRO-ORGANISMOS

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia, Parasitologia e Patologia  
como requisito parcial para obtenção do  
título de Doutor

Doutorando: PAULO ROBERTO DANTAS MARANGONI

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra IDA CHAPAVAL PIMENTEL

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra PATRICIA DO ROCIO DALZOTO

Curitiba  
2014



Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Patologia Básica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**"Formação de biofilmes em Usinas Hidrelétricas, seus efeitos e o controle da Corrosão Influenciada por Micro-organismos"**

**Por**

**PAULO ROBERTO DANTAS MARANGONI**

**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:**

  
**Prof.ª. Dr.ª. Ida Chapaval Pimentel (presidente)**

  
**Prof. Dr. Marcos Antônio Coelho Berton**

  
**Prof.ª. Dr.ª. Rosa Maria Rabelo Junqueira**

  
**Prof.ª. Dr.ª. Vanessa Kava Cordeiro**

  
**Prof. Dr. Juliano de Andrade**

**Curitiba, 31 de março de 2014.**

## DEDICATÓRIA

***Dedico,***

*A quem tudo pertence: “Deus” que sempre esteve do meu lado ... e  
aos meus familiares; em especial meus pais: Paulo Cesar e Wania;*

*minha esposa, Neva e*

*meus irmãos, Victor Hugo e Jéssica,*

*que sempre estiveram ao meu lado e me incentivaram*

*a continuar acreditando em meus sonhos*

*me apoiando, incentivando e caminhando lado a lado.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço às minhas mestres prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Ida Chapaval Pimentel** e prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Patricia do Rocio Dalzoto**. Pela longa jornada de trabalho conjunto, além dos conselhos e ensinamentos.

Sou grato à colaboração e oportunidade oferecida pelo Dr **Marcos Antonio Coelho Berton**, pesquisador do Instituto Senai de Inovação em Eletroquímica que me auxiliou com o conhecimento e aproximação da eletroquímica e às necessidades da indústria para que o desenvolvimento da pesquisa aplicada pudesse fazer parte deste trabalho.

A todos meus colegas de laboratório: **Angela, Mariana Porsani, Sabina, Mariana Fidelis, Germana, Rafaela, Ghenifer, Patricia** que sempre me apoiaram e auxiliaram durante meu período de práticas em laboratório e juntos nos momentos de lazer.

Aos Alunos de iniciação **Diogo Rosso** (PIBITI), **Juliana Kobylanski Jantaglia** (PIBITI), **Alexandre Garus** (PIBITI), **Ana Letícia Prette Bazoli** (Bolsista), **Lucas Andrade** (PIBITI), **Thalita Bastos** (PIBITI), **Ana Paula Martins** (PIBITI), **Felipe Ferrari** (PIBITI) e pelo apoio e dedicação ao trabalho

Agradeço especialmente a amiga e mestre **Carolina Gracia Poitevin**, que tanto contribuiu para este projeto trabalhando lado a lado para a execução das análises e a secretária do Programa de Pós-Graduação **Luciana**.

Obrigado a todos os meus amigos por sempre estarem ao meu lado durante todo o processo que se passou.

A todos os professores e Pesquisadores que de alguma forma contribuíram para o meu desenvolvimento durante meu processo de formação acadêmica Prof (as): **Vânia, Debora, Andrea, Vanessa, Graciela, Daniela, Batista, Maria Aparecida, Arlei, Lilian** e todos que com o seu tempo disponível souberam me receber e orientar de alguma forma, com uma técnica específica ou palavra.

Aos meus familiares, em especial meus Pais, **Paulo Cesar** e **Wania**, irmãos, **Victor Hugo** e **Jéssica**, e em especial à minha esposa **Neva** que me deu suporte nos momentos de dificuldade e alegria durante este desenvolvimento. A todos vocês que apostam em meu potencial e estiveram a todo instante me dizendo palavras de incentivo e estímulo, que foram extremamente importante para que eu chegasse neste ponto de minha vida.

Agradeço ao aporte financeiro dispensado pelo LACTEC e Eletronorte, empresa do sistema Eletrobrás, para que este projeto se desenvolvesse e ao financiamento do CAPES/CNPq através de minha bolsa auxílio, que recebi através de meu esforço e merecimento devido à minha dedicação e perseverança.

*A grande força universal...*

*A Deus*

## RESUMO

A formação de biofilme é um processo caracterizado por uma série de eventos, desde a colonização por micro-organismos pioneiros até a maturação do biofilme, quando surge um microambiente diferenciado que irá propiciar o desenvolvimento de processos biológicos e químicos particulares, como por exemplo a biocorrosão em superfícies metálicas. Este processo de Corrosão Influenciada por Micro-organismos (CIM) pode acelerar os processos físico-químicos relacionados à corrosão e dissolução metálica. O estudo dos eventos relacionados à formação de biofilmes sobre superfícies metálicas mostra-se como uma importante ferramenta para o desenvolvimento de estratégias para o controle do surgimento e evolução da CIM em superfícies metálicas expostas à ação do tempo e principalmente submersas em água, seja ela de origem marinha ou fluvial. Existem vários trabalhos que estudam os sinais moleculares (*Quorum Sensing* – QS) envolvidos na comunicação intercelular responsável por diversas reações dos microrganismos a estímulos externos. As bactérias do gênero *Pseudomonas* sp, por exemplo, utilizam este mecanismo como resposta ao adensamento populacional e isto contribui para o incremento da virulência e formação de biofilmes como mecanismo de defesa, entre outras características. Este trabalho possui como objetivo a avaliação dos biofilmes formados em superfícies metálicas de corpos de prova (CP's) expostos em estações de avaliação de corrosão na Usina Hidrelétrica de Tucuruí, através do isolamento e caracterização morfológica e molecular dos micro-organismos encontrados nas amostras CP's, visando a identificação dos grupos presentes. Também foram avaliados os processos que ocorrem durante a etapa de adesão dos micro-organismos sobre a superfície metálica através de espectroscopia de impedância eletroquímica. Foram caracterizados os CP's coletados periodicamente e através de cultivos microbiológicos e utilização de ferramentas de biologia molecular, foi possível detectar e identificar os micro-organismos normalmente envolvidos na corrosão influenciada por micro-organismos, foram isoladas 358 bactérias das famílias *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Micrococcaceae* e *Bacilliaceae*, além de 94 isolados fúngicos. Também foi confirmada a presença de Bactérias Redutoras de Sulfato e Bactérias Oxidantes do Ferro. Testou-se a sensibilidade de micro-organismos formadores de biofilme contra biocidas utilizados em usinas hidrelétricas e potenciais substitutos para os compostos clorados, além de potenciais compostos oriundos de fontes naturais. Os produtos foram MXD-100®, NaOH e Anólito do sistema ECA (Radical Water®). Os testes com compostos de fontes naturais obtiveram resultados significativos quando comparados aos produtos citados, mas necessitam de maiores estudos para o aperfeiçoamento na utilização em sistemas industriais. Foi desenvolvido um sistema para cultivo em fluxo contínuo onde é possível realizar monitoramento via microscopia ótica e técnicas eletroquímicas para avaliação da formação de biofilme e eficiência na aplicação de biocida para controle dos micro-organismos envolvidos na formação de biofilme. Este trabalho fez parte de projeto de P&D financiado pela Eletronorte, empresa do Sistema Eletrobrás, "Estudo e identificação de alternativas visando controlar o aquecimento nas unidades Geradoras da UHE Tucuruí (Sistema de Arrefecimento)".

Palavras-chave: Hidrelétricas, Biocorrosão, Biofilme

## ABSTRACT

Biofilm formation is a process characterized by a series of events, since the colonization of the surface by microorganisms up to biofilm maturation when a different microenvironment that will facilitate the development of specific chemical and biological processes, such as arises biocorrosion on metal surfaces. This process of Microorganisms Influenced Corrosion (MIC) can accelerate physical and chemical processes related to corrosion and metal dissolution. The study of events related to the formation of biofilms on metal surfaces is shown as an important tool for the development of strategies to control the emergence and evolution of MIC on metal surfaces exposed to weathering and mostly submerged in natural water, be it marine or fluvial origin. There are several works that study the molecular signals "Quorum Sensing – QS" involved in intercellular communication responsible for several reactions of micro-organisms to external stimuli. Bacteria of the genus *Pseudomonas* sp, for example, use this mechanism as a response to population density and this contributes to increased virulence and biofilm formation as a defense mechanism, among other features. This work has as objective the evaluation of biofilms on metal surfaces of Body of Proof (BF) exposed in the evaluation of corrosion stations in Tucuruí Hydroelectric Power Plant through isolation and morphological and molecular characterization of microorganisms found in the samples BF, for the identification of microorganisms genera and species present. Processes that occur during the stage of adhesion of microorganisms on the metal surface by were also evaluated by electrochemical impedance spectroscopy. Was characterized the BF collected periodically through microbiological cultivation and use of molecular biology tools. It was possible to detect and identify microorganisms usually involved in corrosion influenced by microorganisms, were isolated 358 bacteria of the families Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Micrococcaceae and Bacillaceae, and 94 fungal isolates. It has also confirmed the presence of Sulfate Reducing Bacteria and Bacterial Iron oxidizers. We tested the sensitivity of microorganisms against biocides to control biofilm formation and was used the common biocides applied in hydroelectric power plants and the potential replacements for chlorine compounds. The products with significantly percentual of biofilm control compared with Calcium Hypochlorite were MXD- 100 ®, NaOH and Anolyte ECA System (Radical Water ®). Tests with compounds from natural sources yielded significant results when compared to the aforementioned products, but need further studies to improve the use in industrial systems. A system was developed for cultivation streaming where you can perform monitoring via optical microscopy and electrochemical techniques for evaluation of biofilm formation and efficiency in the application of biocide for control of microorganisms involved in biofilm formation. This work was part of the R&D project funded by Eletronorte company Eletrobras System, a Brazilian energy company, "Study and identification of alternatives in order to control the heat generating units Tucuruí (Cooling System)".

**Keywords:** Hydroelectric Power Plant, Biocorrosion, Biofilm



## LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Formação de biofilme em superfície metálica .....	26
Figura 2 - Ciclo do enxofre com atuação de Bactérias oxidantes e redutora de sulfato .....	29
Figura 3 - Reação de oxidação influenciada por bactérias oxidantes do enxofre .....	30
Figura 4 - Reações envolvidas com as Bactérias Redutora de Sulfato (BRS) no processo de corrosão influenciada por micro-organismos. Relação entre bactérias aeróbias e anaeróbias (facultativas e estritas) .....	31
Figura 5 - Representação esquemática do processos eletroquímicos e biológicos envolvidos na corrosão influenciada por bactérias oxidantes do ferro. ....	33
Figura 6 - Corrosão Abiótica, sem influência de micro-organismos .....	43
Figura 7 - Classificação da Corrosão segundo morfologia, forma de ataque e seus mecanismos .....	44
Figura 8 - Circuito elétrico para medições de polarização catódica .....	50
Figura 9 - Representação do logaritmo da corrente aplicada a um eletrodo imerso em uma solução ácida sem ar versus o potencial medido contra um eletrodo de referência. ....	51
Figura 10 - Arranjo experimental de eletrodos e potenciostato/galvnostato utilizados em experimentos para adesão de biofilme.....	52
Figura 11 - Histórico da diversificação da matriz energética brasileira.....	60
Figura 12 - Histórico brasileiro de Geração de energia elétrica por tipo de fonte energética.....	60

Figura 13 – Representação em corte da construção civil de uma Central Geradora Hidrelétrica. ....	61
Figura 14 – Localização geográfica da Usina Hidrelétrica de Tucuruí, Município de Tucuruí (PA) - Brasil.....	64
Figura 15 – Referência da 1ª e 2ª etapas de construção da UHE-Tucuruí e visualização das casas de força (1 e 2) e vertedouro da usina .....	65
Figura 16 – Confeção de Corpos de prova metálicos. Conjunto de eletrodo e barra de rosca com contato metálico (A), Conjunto de eletrodo e barra de rosca dentro do tubo de PVC (B) e Fotografia do arranjo experimental da preparação de corpos-de-prova, etapa de preenchimento dos tubos com resina epóxi bi-componente (C).....	66
Figura 17 – Desenho esquemático da estação de corrosão e identificação da localização dos CP's no ponto de coleta CF1-Máquina 6da UHE-Tucuruí. ....	67
Figura 18 – Detalhamento dos materiais para confecção de tubos com ausência de O <sub>2</sub> .....	73
Figura 19 – Posições dos oligonucleotídeos iniciadores ( <i>primers</i> ) no gene 16S em relação a numeração da <i>E. coli</i> (Daly et al. 2000).....	75
Figura 20 – Contagem microbiológica de Bactérias totais. Valores expressos em log UFC/m <sup>2</sup> de superfície metálica exposta às águas do reservatório da UHE-Tucuruí e dados de chuva bruta (mm) e vazão do rio Tocantins (m <sup>3</sup> /s). ....	79
Figura 21 – Isolados microbianos (Coleta 1). Bacilos gram-positivos com formação de esporos subterminais (A), Bacilos gram-positivos com formação de esporos centrais (B), Leveduras (C), Bactérias em morfologia de estafilococos (D). Aumentos 1000X .....	80
Figura 22 – Isolados microbianos (coleta 2). Bactérias filamentosas gram-positivas (A, B e E), Bacilos gram-positivos (C e D), Bacilo gram-negativo (F). Aumentos de 1000x. ....	80

Figura 23 Bactéria gram-negativa com característica filamentosa. Aumento 1000x.	81
Figura 24 - Contagem microbiológica de fungos. Valores expressos em log UFC/m <sup>2</sup> de superfície metálica exposta às águas do reservatório da UHE-Tucuruí e dados de chuva bruta (mm) e vazão do rio Tocantins (m <sup>3</sup> /s).	82
Figura 25 – Micromorfologia dos fungos isolados dos CP's coleta 1 – UHE-Tucuruí. <i>Penicillium</i> sp (A, B, D e E) 400x, <i>Aspergillus</i> sp (C) 400x, <i>Paecilomyces</i> sp (F) 400x.	83
Figura 26 - Micromorfologia dos fungos isolados dos CP's coleta 2 – UHE-Tucuruí. <i>Aspergillus</i> sp (A, B e C) 400x, <i>Penicillium</i> sp (D) 400x, <i>Cladosporium</i> sp (E) 1000x, <i>Acremonium</i> sp (F) 400x, <i>Paecilomyces</i> sp (G) 400x, <i>Phoma</i> sp (H) 400x.	84
Figura 27 – Sensibilidade de bactérias a agentes de controle microbiológico em meio sólido – teste de disco difusão.	90
Figura 28 - Sensibilidade de bactérias a agentes de controle microbiológico em meio líquido – Turbidimetria	90
Figura 29 - Visão geral do sistema de cultivo monitorado para formação de biofilme	114
Figura 30 - Câmara de cultivo, câmara de mistura e sistema de agitação e aquecimento	114
Figura 31 - Câmara de mistura e sistema de agitação e aquecimento	115
Figura 32 - Detalhe da câmara de mistura, visão inferior e superior	115
Figura 33 - Câmara de cultivo, destaque para área de eletrodos para análise da adesão de biofilmes	116
Figura 34 - Câmara de cultivo, destaque para área de eletrodos para análise eletroquímica	116

Figura 35 – Sistema para cultivo estacionário de micro-organismo e teste da influência da formação de biofilme sobre metais.....	125
Figura 36 - Fotografia do arranjo experimental utilizado para o estudo da adesão e desenvolvimento de biofilme sobre superfície de platina. As duas células de medidas, sem inóculo e com inóculo, foram mantidas a 37° C.....	127
Figura 37 - Diagrama esquemático das etapas de adesão bacteriana e formação de biofilme em superfícies sólidas em meio aquoso .....	128
Figura 38 - Imagens de microscopia ótica indicando os estágios da formação do biofilme da bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sobre eletrodo de platina. ....	129
Figura 39 – Diagramas de Nyquist obtidos em diferentes tempos do contato do eletrodo de platina em meio de cultivo M9 inoculado com bactéria <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	130
Figura 40 - Circuito equivalente descrevendo as interações eletroquímicas entre o biomaterial e a superfície condutora de platina .....	132
Figura 41 - Curva de ajuste das medidas experimentais tempos de 1,5 h (A) e 24h (B) .....	133
Figura 42 - Perfil da variação da resistência (R2) do biomaterial para diferentes períodos de deposição da adesão da <i>Pseudomona Aeruginosa</i> .....	134
Figura 43 - Espectros de Impedância Eletroquímica em diferentes tempos de ensaio .....	139
Figura 44 - Imagem ótica da superfície da platina após 24h de ensaio .....	139
Figura 45 - Espectros de Impedância Eletroquímica após mudança na vazão do inóculo de 8 mL/h para 42 mL/h .....	140
Figura 46 - Imagem ótica da superfície da Platina após 1,5 h após mudança na vazão do inóculo de 8 mL/h para 42 mL/h .....	141

Figura 47 - Variação do potencial de circuito aberto em função do tempo..... 142

Figura 48 - Imagem ótica da superfície da Platina após a primeira injeção de anólito da Radical Waters (região B - C)..... 143

Figura 49 - Imagem ótica da superfície da Platina após a segunda injeção de anólito da Radical Waters (região D - E)..... 143

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Quantidade de Enxofre contido em vários componentes (camadas) da Terra.....	28
Quadro 2 – Antimicrobianos aplicados ao controle de biofilmes formados por bactérias encontradas normalmente em indústria de processamento do leite .....	38
Quadro 3 – Seleção de biocidas industriais .....	39
Quadro 4 – Centrais Geradoras de Energia Elétrica em Operação no Brasil .....	57
Quadro 5 – Centrais Geradoras de Energia Elétrica em Construção no Brasil .....	57
Quadro 6 – Centrais Geradoras de Energia Elétrica Outorgadas que ainda não foram construídas no Brasil.....	57
Quadro 7 – Centrais Geradoras de energia Elétrica do Brasil por região .....	58
Quadro 8 - Matriz energética Brasileira por fontes de energia para produção de energia elétrica.....	59
Quadro 9 – Cronograma de execução das coletas – UHE-Tucuruí. ....	67
Quadro 10 – Sequências de oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificação de regiões do DNAr 16S recomendadas para identificação de grupos BRS (Daly et al. 2000).....	75
Quadro 11 – Relação dos CP's coletados, identificação da localização das amostras, data de coleta e período de exposição.....	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Caracterização dos CP's de aço carbono (AC) expostos nas estações de corrosão na UHE-Tucuruí período de 2011-2012 .....	78
Tabela 2 – Dados da Resistência da Solução “R1”, Capacitância di biofilme “CPE1” e Resistência do Biofilme “R2” para ajuste do Modelo de Circuito equivalente .....	135

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS e SÍMBOLOS

**ATP**- Adenosina Tri-fosfato  
**BRS** - Bactérias Redutora de Sulfato  
**CGH** - Central Geradora Hidrelétrica  
**CIM** - Corrosão Influenciada por Micro-organismos  
**CP** - Corpo de prova metálico  
**DNA** - ácido Desoxirribonucleico  
**DNAr** - DNA ribossomal  
**EOL**- Central Geradora Eolielétrica  
**GW** - unidade de energia *gigawatts*, equivalente  $10^9$  W (watt)  
**ITS1** - Regiões inter-espaçadora eucariotos (18S – 5,8S)  
**ITS2** - Regiões inter-espaçadora eucariotos (5,8S – 28S)  
**kW** - unidade de energia *kilowatts*, equivalente  $10^3$  W (watt)  
**MW** - unidade de energia *megawatts*, equivalente  $10^6$  W (watt)  
**GW** - unidade de energia *gigawatts*, equivalente  $10^9$  W (watt)  
**MEV** - Microscopia eletrônica de varredura (MEV)  
**MPE** - Material polimérico extracelular  
**mRNA** - ácido ribonucleico mensageiro  
**PCH** - Pequenas Centrais Hidrelétricas  
**PCR** - Reação em cadeia da polimerase (*Polimerase chain reaction*)  
**Primer** - Oligonucleotídeos iniciadores  
**QS** - Sensor de *quorum* (*Quorum sensing*)  
**RNAr** - ácido ribonucleico ribossômico  
**S** - Enxofre elementar  
**SOL** - Central Geradora Solar Fotovoltáica  
**UHE** - Usina Hidrelétrica de Energia  
**UTE** - Usina Termelétrica de Energia  
**UTN** - Usina Termonuclear  
**ATCC**: American Type Culture Collection  
**DO<sub>600</sub>**: densidade óptica a 600 nm  
**EDTA**: ácido etilenodiamino tetra-acético  
**D**: vazão específica de alimentação ( $\text{h}^{-1}$ )  
**D<sub>c</sub>**: vazão específica de alimentação a partir da qual ocorre lavagem do reator ( $\text{h}^{-1}$ )  
 **$\mu$** : velocidade específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ )  
 **$\mu_{\text{max}}$** : velocidade específica de crescimento máxima ( $\text{h}^{-1}$ )  
 **$\mu_{\text{s}}$** : velocidade específica de consumo de glicose ( $\text{g}_{\text{glicose}}.\text{g}_{\text{célula}}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )  
 **$Y_{\text{x/s}}$** : fator de conversão de glicose a células ( $\text{g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{glicose}}$ )



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>CAPÍTULO 1 - Introdução.....</b>	<b>20</b>
1.1	JUSTIFICATIVA.....	20
1.2	OBJETIVOS .....	23
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO 2 - Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>24</b>
2.1	Formação do Biofilme.....	24
2.1.1	Fisiologia microbiana .....	27
2.1.2	Bactérias Oxidantes do Enxofre.....	29
2.1.3	Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS).....	30
2.1.4	Bactérias Oxidantes do Ferro.....	32
2.1.5	<i>Bacillus</i> , Enterobactérias e <i>Pseudomonas</i> .....	33
2.1.6	Fungos.....	35
2.2	Biocidas .....	36
2.3	Corrosão Influenciada por Micro-organismos (CIM) .....	40
2.3.1	Micro-organismos envolvidos com a Corrosão Influenciada por Micro-organismos 45	
2.3.2	Reservatório de usinas hidrelétricas, formação do reservatório e potenciais dificuldades .....	45
2.4	Técnicas moleculares .....	46
2.5	Avaliação da adesão de micro-organismos utilizando ferramentas eletroquímicas .....	49
2.6	Centrais Geradoras de Energia Elétrica - Brasil .....	56
2.6.1	Composição de Centrais Geradoras Hidrelétricas .....	60
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO 3 - Caracterização de biofilme em corpos de prova metálicos, Usina Hidrelétrica de Tucuruí.....</b>	<b>64</b>
3.1	Metodologia .....	64

3.1.1	Área experimental .....	64
3.1.2	Preparo de amostra .....	65
3.1.3	Arranjo experimental .....	66
3.1.4	Meios de cultivo .....	68
3.1.5	Soluções e Reagentes .....	69
3.1.6	Análise dos corpos de prova (inóculo) .....	71
3.1.7	Isolamento de bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas Totais 71	
3.1.8	Presença / Ausência de bactéria oxidante de ferro .....	72
3.1.9	Presença / Ausência de bactérias redutoras de sulfato .....	72
3.1.10	Isolamento de Fungos.....	73
3.1.11	Identificação de micro-organismos.....	74
3.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	76
3.2.1	Isolamento de bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas Totais 78	
3.2.2	Presença / Ausência de bactéria oxidante de ferro .....	81
3.2.3	Presença / Ausência de bactérias redutoras de sulfato .....	81
3.2.4	Isolamento de Fungos.....	82
<b>4</b>	<b>Capítulo 4 - Avaliação da sensibilidade de micro-organismos potencialmente formadores de biofilme a diferentes biocidas .....</b>	<b>85</b>
4.1	Atividade Antimicrobiana em Meio sólido .....	85
4.2	Atividade Antimicrobiana em meio líquido .....	86
4.3	Delineamento experimental .....	87
4.4	Resultados.....	87
<b>5</b>	<b>Capítulo 5 - Desenvolvimento e padronização de dispositivo para MONITORAMENTO DA FORMAÇÃO de biofilme em superfície metálica.....</b>	<b>93</b>
5.1	Descrição da Patente do sistema para formação de biofilme.....	93

5.2	REIVINDICAÇÃO .....	110
5.3	RESUMO .....	113
5.4	Figuras e imagens do sistema descrito .....	114
5.5	CULTIVO EM BIORREATORES .....	116
5.5.1	Cultivo Contínuo.....	117
<b>6</b>	<b>Capítulo 6 - Avaliação eletroquímica da adesão de bactérias sobre superfície metálica .....</b>	<b>121</b>
6.1	Etapa 1 – cultivo estacionário.....	122
6.1.1	Metodologia .....	122
6.1.2	Resultados .....	126
6.1.3	Conclusões para Etapa 1 – cultivo e formação de biofilme em sistema estacionário	135
6.2	Etapa 2 – cultivo em fluxo.....	136
6.2.1	Metodologia .....	136
<b>7</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>145</b>
<b>8</b>	<b>TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>147</b>
<b>9</b>	<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>149</b>
<b>10</b>	<b>Apendice A .....</b>	<b>166</b>
<b>11</b>	<b>Apendice B .....</b>	<b>168</b>
<b>12</b>	<b>Apendice C .....</b>	<b>170</b>
<b>13</b>	<b>Apendice D .....</b>	<b>176</b>
<b>14</b>	<b>ANEXO A .....</b>	<b>187</b>

## CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 JUSTIFICATIVA

A matriz energética brasileira compreende: hidrelétricas, termoeletricas (gás, petróleo, biomassa, nuclear e carvão mineral) e centrais geradoras eólica e solar. Porém, dentre todas estas fontes, 67,91% da produção de energia brasileira é oriunda de hidrelétricas, com apenas 1091 Unidades Geradoras, do total de 3040 Centrais Geradoras Elétricas já instaladas (ANEEL, 2014). Um dos grandes problemas enfrentados por Centrais Geradoras Hidrelétricas é a formação de biofilmes sobre a superfície de metais submersos e em contato com a água do reservatório, principalmente as peças fabricadas com aço carbono.

Biofilme pode ser definido como um consórcio de organismos sobre um substrato e seus materiais extracelulares secretados no meio. A formação de biofilmes é um processo em que um substrato deve ser colonizado por tais organismos e a deposição de material orgânico produzido pelos mesmos fornece suporte e nutrientes para uma grande variedade de seres, principalmente micro-organismos. Esta deposição, também conhecida como bioincrustação, sofre grande influência de micro-organismos, pois estes possuem a habilidade de excretar material exopolimérico (MPE – material polimérico extracelular ou em inglês *extracellular polymeric substances - EPS*) formando agregados polimicrobianos. Em um biofilme, que pode ser um filme, floco ou lama, os micro-organismos representam menos de 10% da massa seca, enquanto a matriz pode representar até 90% (FLEMMING, WINGENDER, 2010).

A presença de micro-organismos e seus metabólitos (EPS) podem desencadear vários processos: Corrosão Influenciada por Micro-organismos (CIM), entupimentos e incrustações (MITTELMAN, 1998; VIEIRA *et al.*, 1993). Existe uma maior resistência microbiana à ação de biocidas em biofilmes (sésseis) do que pelos micro-organismos de vida livre (Planctônicos) e isto pode acarretar problemas sérios em determinados setores industriais ou da saúde (MAH, O'TOOLE, 2001; DOLAN, COSTERTON, 2002; STEWART, COSTERTON, 2001; SIMÕES *et al.* 2006; SIMÕES,

VIEIRA, 2009; LANGSRUD *et al.*, 2003). Os estudos dos mecanismos envolvidos neste processo fornecem suporte para que estratégias mais efetivas possam ser traçadas e efetivamente atingir estes micro-organismos (MAPELLI ET AL. 2008) podendo, assim, estabelecer um controle eficaz e evitar os problemas decorrentes da formação de biofilmes.

Diversos setores são afetados pela corrosão influenciada por micro-organismos (CIM): indústrias em geral, tubulações e vedações de tanques de combustível (BEECH, GAYLARDE, 1999). A CIM é o processo eletroquímico de dissolução metálica iniciada ou acelerada por micro-organismos, principalmente bactérias redutoras de sulfato (BRS).

Nem todos os biofilmes são prejudiciais, existem vários relatos sobre processos que utilizam a formação de biofilmes para ganho de rendimento em processos, aproveitando a dinâmica da agregação de micro-organismos para aumentar a eficiência na conversão de compostos, por exemplo no tratamento de efluentes e remoção de poluentes em estações de tratamento de resíduos urbanos (LIU *et al.* 2004; MATSUMOTO *et al.*, 2007; MIQUELETO *et al.*, 2010).

O isolamento e a identificação de micro-organismos envolvidos na biocorrosão de metais constituem importantes ferramentas para o entendimento do processo, mas nem sempre esta estratégia permite uma visão global dos mecanismos envolvidos neste processo, já que a cooperação entre os micro-organismos pode acarretar em vias metabólicas diferenciadas quando estes estão isolados ou em conjunto com outras espécies (WINTERMUTE, SILVER, 2010). Existiam poucos registros do isolamento de micro-organismos relacionados à biocorrosão (bactérias oxidantes do ferro, bactérias sulfato redutoras e bactérias oxidantes do enxofre), devido à dificuldade em se isolar e manter este tipo de cultura. Estes normalmente são identificados *in situ* ou associados a outros micro-organismos, podendo ser caracterizados por meio de microscopia, com diferentes métodos de coloração (DALY *et al.*, 2000). Estratégias para o isolamento de alguns micro-organismos de interesse envolvem variações de fonte de carbono e nitrogênio, além de vários aceptores de elétrons (APHA *et al.*, 2005).

Uma opção para a detecção destes micro-organismos é o emprego de ferramentas de biologia molecular (DALY *et al.*, 2000), como a utilização de oligonucleotídeos iniciadores específicos para sequências de Bactérias Redutoras de Sulfato. Com a aplicação desta metodologia pode-se identificar micro-organismos presentes em amostras de biofilme sem a necessidade de seu isolamento, já que a obtenção de culturas puras destes organismos é extremamente laboriosa, devido ao grau de exigência nutricional e fisiológica. Grupos de bactérias redutoras de sulfato (BRS) podem ser encontrados a partir da purificação de DNA total de uma amostra ambiental e posterior amplificação com oligonucleotídeos complementares específicos a porções das sequências do DNAr 16S (DEVEREUX *et al.*, 1992).

Existem sinais moleculares (*quorum sensing*) responsáveis pelo adensamento populacional de micro-organismos envolvidos com o processo de formação de biofilmes, luminescência, conjugação, produção de antibióticos e corrosão influenciada por micro-organismos (DEFOIRDT *et al.*, 2006). Bactérias do gênero *Pseudomonas* estão entre os micro-organismos mais comumente envolvidos com a formação de biofilmes, especificamente *P. aeruginosa*, que utiliza N-(3-Oxododecanoyl)-(Lhomoserine lactone) (3-Oxo-C<sub>12</sub>-HSL) como sinal molecular e o grupo de proteínas regulatórias LasI/LasR (KIEVIT, IGLEWSKI, 2000).

O presente trabalho, portanto, teve como objetivo principal a investigação da formação de biofilmes sobre superfícies metálicas instaladas na Usina Hidrelétrica de Tucuruí (PA), Brasil. Os desdobramentos desta investigação levaram à análise dos seus efeitos sobre os metais (corrosão influenciada por micro-organismos) e ao desenvolvimento de estratégias de controle de sua formação. Ainda, os micro-organismos isolados destes biofilmes foram identificados por meio de metodologias clássicas e moleculares, além da utilização de técnicas eletroquímicas e de cultivo microbiológico para identificação dos fenômenos envolvidos na formação do biofilme fornecendo subsídios para minimizar os danos causados pela bioincrustação e biocorrosão em diferentes materiais.

Este trabalho é composto inicialmente pela definição de biofilme e seu caráter multicelular, mostrando a complexidade da formação do biofilme e os fatores necessários para que este possa se formar sobre os mais diversos tipos de substratos.

Serão mostrados aspectos importantes relacionados à resistência microbiana a biocidas, consequência da formação de biofilme, onde este aumenta a proteção dos micro-organismos envolvidos e dificulta a limpeza e desinfecção de superfícies onde existe um biofilme aderido.

Todo este processo influencia diretamente diversos setores industriais e da saúde, mas no presente trabalho serão discutidos os aspectos pertinentes a formação de biofilmes sobre superfícies metálicas e o processo de Corrosão Influenciada por Micro-organismos (CIM), além disso, será abordada especificamente a problemática encontrada na Usina Hidrelétrica de Tucuruí, situada no Município de Tucuruí (PA) – Brasil.

Serão descritas metodologias empregadas no processo de caracterização dos micro-organismos encontrados nas amostras de metal expostas à influência das águas do Rio Tocantins, que compõem o reservatório da UHE-Tucuruí, e das técnicas empregadas para avaliação da evolução da formação do biofilme e posterior controle através da aplicação de biocidas que estão sendo testados no presente trabalho.

## 1.2 OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo principal a caracterização dos biofilmes formados sobre as superfícies dos metais, em corpos de prova (CP's) instalados em diversos pontos de coleta na Usina Hidrelétrica de Tucuruí – Município de Tucuruí (PA), em estações de avaliação de corrosão e monitorar os fenômenos envolvidos na adesão de bactérias *Pseudomonas aeruginosa* sobre as superfícies metálicas.

E como objetivos específicos:

- a. Caracterização dos micro-organismos que atuam no processo de corrosão influenciada por micro-organismos (CIM) na Usina Hidrelétrica de Tucuruí, Município de Tucuruí (PA) – Brasil; (Capítulo 3)
- b. Avaliação da sensibilidade de micro-organismos potencialmente formadores de biofilme a diferentes biocidas; (Capítulo 4)
- c. Desenvolvimento e padronização de dispositivo para monitorar a formação de biofilme em superfície metálica; (Capítulo 5)
- d. Avaliação eletroquímica da adesão de bactérias sobre superfície metálica; (Capítulo 6)

## CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Formação do Biofilme

A formação de biofilmes microbianos é uma resposta a estímulos externos do meio ambiente, onde estes micro-organismos estão inseridos, através de várias estratégias: aglomeração, lípase bacteriana, virulência, formação de biofilme, entre outras (WAGNER *et al.*, 2006; RUMJANEK *et al.*, 2004). Uma resposta atualmente bastante estudada é o *Quorum Sensing* (QS) que pode influenciar todos os fenótipos citados anteriormente (SPOERING, GILMORE, 2006).

Esta adesão microbiana é dependente de uma cadeia de fatores que são conjugados ao mesmo tempo e coordenados por um objetivo comum, a sobrevivência da “comunidade”. A busca por um substrato para fixar-se e o adensamento da população dará origem ao biofilme que fornecerá proteção e maiores possibilidades de resistência a processos de limpeza e desinfecção. A ligação destas células ao substrato ocorre devido a forças eletrostáticas (MULVEY, HULTGREN, 2004), deposição de material orgânico e secreção de material polimérico extracelular (MPE) (FLEMMING, WINGENDER, 2010; WINTERMUTE, SILVER, 2010). São encontradas também estruturas na membrana de bactérias que contribuem para o processo de adesão, como os vários tipos de adesinas e moléculas receptoras. Normalmente estas moléculas são componentes de filamentos, “pili” ou “fímbrias”, ou proteínas multiméricas ancoradas na membrana bacteriana. Além das estruturas protéicas encontram-se lipopolissacarídeos (LPS) sintetizados por bactérias Gram-negativas (MULVEY, HULTGREN, 2004; WHITFIELD, 2004) e ácidos lipoteicóicos em algumas bactérias Gram-positivas, que também funcionam como moléculas de adesão (MULVEY, HULTGREN, 2004).

Em geral, a bioincrustação resulta do acúmulo de biofilmes. Um biofilme é constituído por células imobilizadas sobre um substrato, incluídas em uma matriz orgânica de polímeros extracelulares produzida por micro-organismos e genericamente denominada material polimérico extracelular (MPE), que representa um dos principais componentes do biofilme. Outro componente importante para a



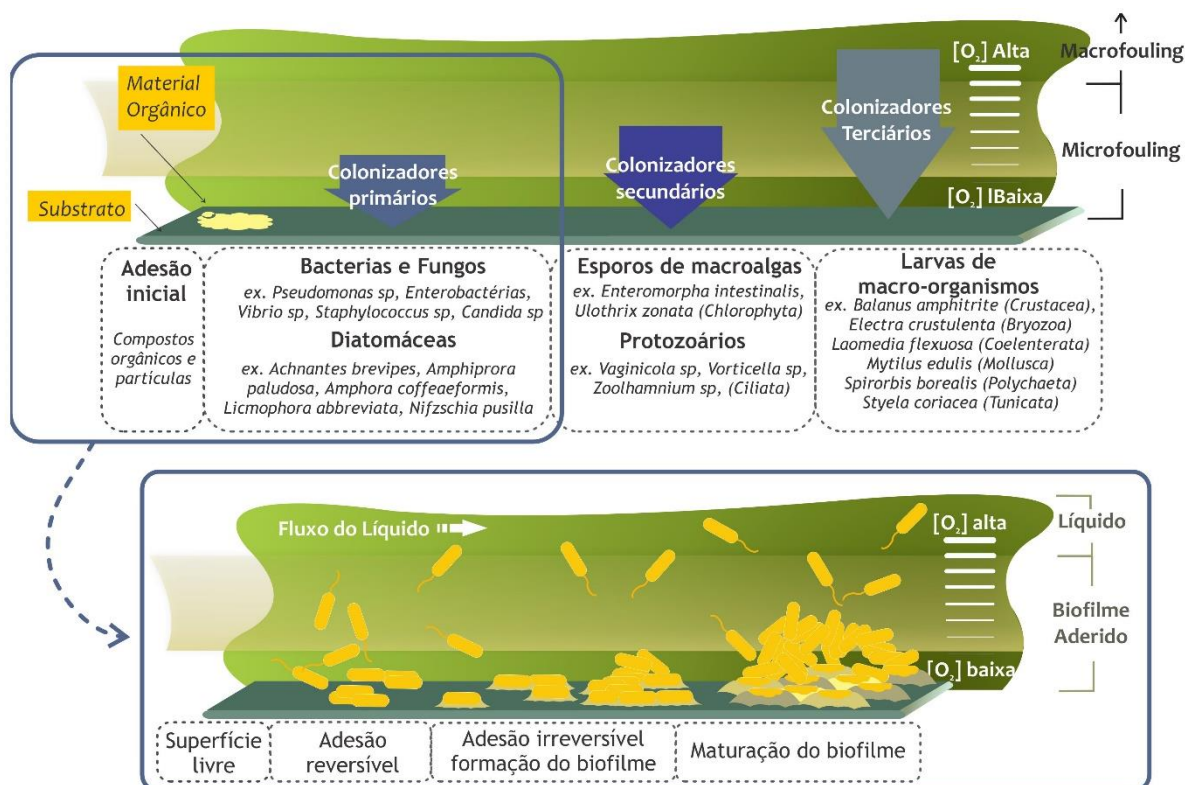
adesão microbiana é a presença de glicocálix, que representa a matriz polissacarídica que envolve as células individualmente (ELVERS, LAPPIN-SCOTT, 2004).

O comportamento das bactérias sésseis é diferente daquele apresentado por bactérias de vida livre e das cultivadas em meios seletivos de isolamento. O metabolismo bacteriano é diferenciado devido à presença de outros micro-organismos e da nova condição adotada (fixação em superfície) (NIGAUD *et al.*, 2010). Exemplos de modificações do metabolismo são a produção de metabólitos poliméricos (MPE) secretados por estes micro-organismos (COETSER, CLOETE, 2005) e modificações no nível de secreção de fatores responsáveis pelo sensor de *quorum* (QS) (WILLIAMS, CÁMARA, 2009). A bioincrustação pode ocorrer tanto em fluxos turbulentos como em águas paradas, sobre diversos tipos de superfícies, metálicas ou não, lisas ou em fissuras (crevices) (VIDELA, 2003).

Sobre um metal em contato com águas, ocorrem processos biológicos, que produzem a bioincrustação, e processos inorgânicos, cujo resultado é a corrosão. Ambos os fenômenos modificam de forma intensa o comportamento da interfase metal/solução. Os processos biológicos (bioincrustação) e os processos inorgânicos (corrosão) ocorrem de forma simultânea, mas seguem direções opostas. A bioincrustação é um processo de acumulação que se dirige do seio do líquido para a superfície metálica, já a corrosão transcorre no sentido oposto, da superfície metálica (que se dissolve) para o seio do fluido. Como consequência de ambos os processos, forma-se uma nova interfase metal/solução, onde ocorre o desenvolvimento da corrosão microbiológica (VIDELA, 2003).

Uma das teorias que explica a formação de biofilmes é a descrita por Marshall, Stout e Mitchell (MARSHALL *et al.*, 1971), a qual ressalta que a adesão é um processo que ocorre em duas fases. Na primeira fase, o processo é ainda reversível, em função do processo de adesão do micro-organismo na superfície ocorrer por meio de forças de Van der Waals e atração eletrostática (MULVEY, HULTGREN, 2004). Na segunda etapa, ocorre a interação física da célula com a superfície através de material extracelular de natureza polissacarídica ou protéica produzida pela bactéria, denominado glicocálix, que suporta a formação de biofilmes (FIGURA 1). O glicocálix favorece o processo de adesão superficial, e vai fornecer condições de adesão do

peptidoglicano das bactérias Gram-positivas e a parte externa, membrana externa, das Gram-negativas (PARIZZI, 1998).



**Figura 1 - Formação de biofilme em superfície metálica**

Fonte: Autor, adaptado (YEBRA *et al.*, 2004)

Vários fatores contribuem para a adesão de uma bactéria à determinada superfície e dependem não só da fisiologia do micro-organismo, mas também da natureza do substrato (SURMAN *et al.*, 1996). Segundo Wicken (1985), citado por Costa (COSTA, 1999), as células bacterianas, possuem carga negativa; nas Gram-positivas a carga negativa é originária dos ácidos teicóicos e teicurônicos da parede e dos polipeptídeos do glicocálix, enquanto nas Gram-negativas é oriunda dos lipopolissacarídeos e proteínas da membrana externa em conjunto com os polímeros do glicocálix (MULVEY, HULTGREN, 2004).

Além desses fatores existem sinais moleculares (*quorum sensing*) responsáveis pelo desenvolvimento de biofilmes. Em bactérias gram-negativas o principal sinal molecular *quorum-sensing* (QS) estudado são as “N-acylhomoserine lactones” (AHLs) (WHITEHEAD *et al.*, 2001), no entanto alguns sistemas não

dependentes das AHLs foram detectados (WILLIAMS, CÁMARA, 2009). Por outro lado as bactérias gram-positivas utilizam sinais moleculares *quorum-sensing* cujos peptídeos sofrem modificação pós-traducional dos peptídeos (WILLIAMS *et al.*, 2000).

Existem dados de que sinais moleculares QS foram detectados em efluente de biofilmes vivos de vários ambientes naturais. Além disso, testes com cepas de *Pseudomonas aeruginosa* com incapacidade de sintetizar 3-oxo-C12-HSL (AHLs) mostraram uma sensibilidade muito maior para o tratamento antimicrobiano. Esta observação sugere que não só a sinalização “QS” é facilitada em um biofilme, mas estas moléculas podem também desempenhar um papel importante no desenvolvimento do filme microbiano. Portanto nota-se um importante papel nos sinais moleculares de *quorum sensing* e o papel universal em biofilmes de diferentes bactérias (FUQUA, 2004).

Um exemplo de *quorum sensing* em bactérias gram-positivas é a regulação peptídica que ocorre em *Staphylococcus aureus*, que normalmente existe em baixas concentrações em seres humanos, mas que pode se tornar patogênico quando são inseridos no corpo humano em sítios diferentes dos que normalmente sobrevivem em níveis basais. A estratégia dupla deste micro-organismo envolve uma manutenção de atividade basal em baixa densidade populacional, mas uma agressiva ação com produção de toxinas e proteases quando em alta densidade populacional. Este processo é regulado pelo sistema “Agr quorum-sensing”, que é composto pelo peptídeo de auto-indução de *Staphylococcus aureus* (AIP) decodificado pela *agrD* e dois componentes sensor resposta-quinase regulados pelo par *agrC* e *agrA* (WATERS, BASSLER, 2005).

### 2.1.1 Fisiologia microbiana

“Como destacaram Ehrlich (1981) e Rossi (1990), a descoberta da bactéria *Gallionella ferruginea* como agente responsável por depósitos ocre de ferro em pântanos, feita por C. S. Ehrenberg em 1838, pode ser considerada marco inicial dessa área da ciência (MELO, AZEVEDO, 1997).

Muitas bactérias relacionadas ao processo de corrosão fazem parte do ciclo do enxofre na natureza (FIGURA 2). O Enxofre é o 8º (oitavo) elemento mais

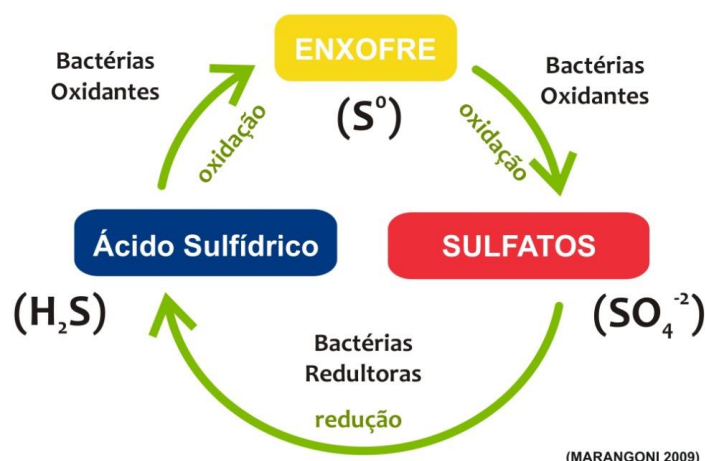
abundante da atmosfera solar e o 14º (décimo quarto) elemento mais abundante da crosta terrestre. A camada da Litosfera é a principal fonte de enxofre no planeta e contém 95% deste elemento, em segundo lugar estão os Oceanos que comportam aproximadamente os 5% restantes. O Quadro 1 mostra a quantidade de enxofre encontrado nas diversas camadas e componentes da Terra (LENS *et al.*, 2004). Este ciclo é composto por micro-organismos com diversidade metabólica, capazes de metabolizar compostos de enxofre por duas formas: Quimioautotrófica e Quimioheterotrófica. Os quimioautotróficos utilizam os elétrons de compostos orgânicos reduzidos como fonte de energia, utilizando CO<sub>2</sub> como sua principal fonte de carbono. As fontes inorgânicas de energia incluem sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) para *Beggiatoa*; enxofre elementar (S) para *Thiobacillus thiooxidans*; íons ferro (Fe<sup>2+</sup>) para *Thiobacillus ferrooxidans*. A energia derivada da oxidação destes compostos inorgânicos é eventualmente armazenada em ATP, que é produzido pela fosforilação oxidativa (COETSER, CLOETE, 2005).

**Quadro 1 – Quantidade de Enxofre contido em vários componentes (camadas) da Terra**

<i>Componente (camada)</i>	<i>Quantidade de Enxofre (Kg)</i>
Atmosfera	4,8 x 10 <sup>9</sup>
Litosfera	2,4 x 10 <sup>19</sup>
Hidrosfera marinha	1,3 x 10 <sup>18</sup>
Água doce	3,0 x 10 <sup>12</sup>
Organismos Marinhos	2,4 x 10 <sup>11</sup>
Solo (Pedosfera)	2,6 x 10 <sup>14</sup>
Camada orgânica do solo	1,0 x 10 <sup>13</sup>
Biosfera	8,0 x 10 <sup>12</sup>

Fonte: (LENS *et al.*, 2004)

Os quimioheterotróficos utilizam especificamente elétrons a partir de átomos de hidrogênio de compostos orgânicos como fonte de energia. Esta categoria de micro-organismos pode utilizar vários compostos como aceptores finais da cadeia respiratória: nitrato, nitrito, sulfato, Fe<sup>3+</sup>, enxofre, exceto oxigênio (respiração anaeróbica) (TORTORA *et al.*, 2005). Alguns podem utilizar fumarato e piruvato, por exemplo, e, originalmente, foram classificados em dois gêneros *Desulfovibrio* e *Desulfomaculum*, pertencentes ao grupo das Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS).



**Figura 2 - Ciclo do enxofre com atuação de Bactérias oxidantes e redutora de sulfato**

Fonte: Autor

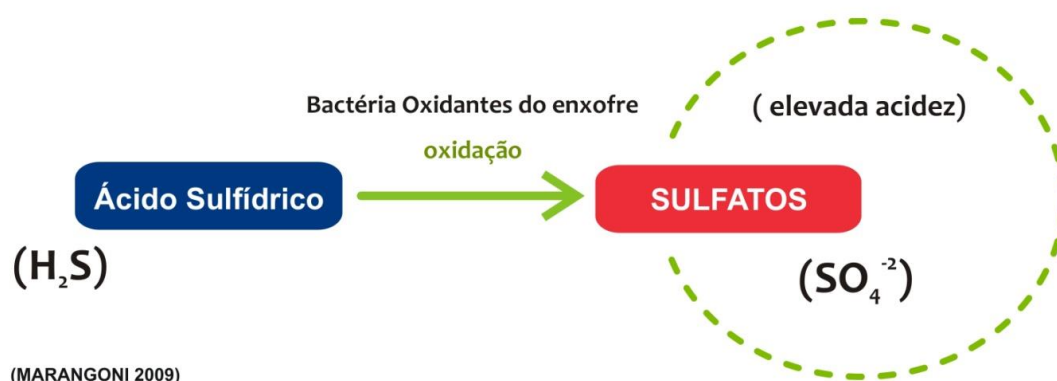
### 2.1.2 Bactérias Oxidantes do Enxofre

Bactérias do Gênero *Thiobacillus* sp são capazes de oxidar enxofre produzindo ácido sulfúrico. Diversas reações de oxidação provocadas por estas bactérias estão relacionadas a processos de biocorrosão que utilizam enzimas específicas, ligadas a um sistema de transporte de elétrons, em que o oxigênio atua como receptor final. Estes micro-organismos podem gerar grandes quantidades de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) como resíduo de seu metabolismo. Este irá compor a gama de materiais que estão agredindo o metal e expondo cada vez mais íons  $Fe^{2+}$  (íon ferroso) para outras classes de micro-organismos, por exemplo bactérias oxidantes do ferro (COETSER, CLOETE, 2005; LENS *et al.*, 2004).

Reações de oxidação parcial de sulfeto, enxofre elementar e oxi-ânions de enxofre são frequentes em associações microbianas, em que participam também as bactérias anaeróbicas redutoras de sulfato, de reconhecida corrosividade. *Thiobacillus ferroxidans* está relacionado com as bactérias oxidantes de ferro por sua capacidade de oxidar compostos inorgânicos de íons ferrosos e também por obter energia da oxidação do tiosulfato (VIDELA, 2003; LENS *et al.*, 2004).

Estes micro-organismos são capazes de crescer na presença e ausência do oxigênio, utilizam o  $CO_2$  como fonte de carbono e podem crescer em anaerobiose,

utilizando nitratos como receptores de elétrons. Acidificam o meio através da oxidação de sulfetos ou enxofre e produzem ácido sulfúrico. Essa elevada acidez confere grande agressividade à superfície onde se encontra instalado o biofilme (FIGURA 3) (LENS *et al.*, 2004).



**Figura 3 - Reação de oxidação influenciada por bactérias oxidantes do enxofre**

Fonte: Autor

Estes micro-organismos normalmente são isolados de ambientes marinhos ou água, consequência da presença de sulfetos e enxofre nestes ambientes. Normalmente não crescem em culturas puras, isolados de outros micro-organismos (LENS *et al.*, 2004).

As bactérias oxidantes do enxofre, ex *Thiobacillus thiooxidans*, são aeróbias e autotróficas, sintetizando seu material celular de compostos inorgânicos de carbono e nitrogênio. A energia para essa síntese é proveniente da oxidação do enxofre ou seus compostos e um dos exemplos dessa via é a seguinte reação:  $2S + 3O_2 + 2H_2O \rightarrow 2H_2SO_4$  ou  $4FeS + 9O_2 + 4H_2O \rightarrow 4H_2SO_4 + 2Fe_2O_3$  (GENTIL 2011).

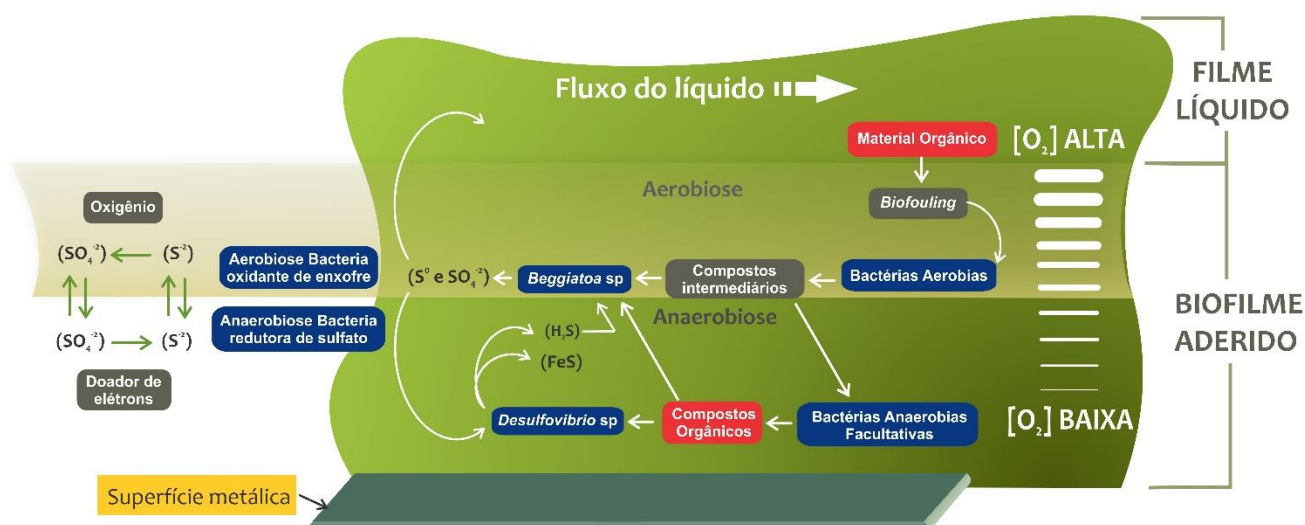
### 2.1.3 Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS)

Diversos modelos foram estabelecidos para explicar os mecanismos que as BRS utilizam para acelerar a corrosão de superfícies metálicas: despolarização catódica por hidrogenase (BRYANT *et al.*, 1991), despolarização anódica (SALVAREZZA *et al.*, 1984; DAUMAS *et al.*, 1988), sulfetos (LITTLE *et al.*, 1988),

componentes fosforosos voláteis (IVERSON, OLSON, 1983), sulfetos induzindo stress e rompimento por corrosão (EDYVEAN *et al.*, 1998), hidrogênio induzindo rompimento (EDYVEAN *et al.*, 1998) e exopolímeros com ferro ligado (BEECH, GAYLARDE 1999; ZINKEVICH *et al.*, 1996; BEECH, CHEUNG, 1995).

Além destes mecanismos, existe a atividade redutora de sulfato. Os sulfetos produzidos são corrosivos, no entanto, alguns derivados químicos dos sulfetos não possuem o mesmo grau de corrosividade (MCNEIL, LITTLE, 1990; THOMAS, *et al.*, 1988), demonstrando a importância dos bioprocessos e a irrelevância de experimentos que não levam em consideração o fator microbiológico.

A hidrogenase de *Desulfovibrio vulgaris* é regulada pelo íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), disponibilizando outro mecanismo para a corrosão, demonstrado por Cheung e Beech (1996). No entanto, o mecanismo de influência dos íons ferro na corrosão influenciada por bactérias redutoras de sulfato (BRS) é um mecanismo complexo (VIDELA, 2002) (FIGURA 4).



**Figura 4 - Reações envolvidas com as Bactérias Redutora de Sulfato (BRS) no processo de corrosão influenciada por micro-organismos. Relação entre bactérias aeróbicas e anaeróbicas (facultativas e estritas)**

Fonte: Autor

Este grupo de bactérias pode influenciar na velocidade das reações anódicas e catódicas, devido a ausência de oxigênio estes micro-organismos retiram a energia

necessária ao seu metabolismo da seguinte reação de oxirredução:  $4\text{Fe} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{SO}_4^{2-} + 2\text{H}_2\text{CO}_3 \rightarrow 3\text{Fe}(\text{OH})_2 + \text{FeS} + 2\text{HCO}_3^-$ . A corrosão, nesses casos, é caracterizada pela presença de tubérculos, embaixo dos quais se notam profundos pites e presença de sulfeto de ferro, de cor preta, no produto da corrosão. A presença de sulfeto de Ferro (FeS) não é conclusiva da presença destes micro-organismos e por isso da necessidade de análise microbiológica (GENTIL, 2011).

#### 2.1.4 Bactérias Oxidantes do Ferro

Essas bactérias de grande diversidade estrutural apresentam a capacidade de oxidar o íon ferroso a férrico. Além da influência sobre a corrosão através dos metabólitos gerados, são capazes de produzir flóculos e depósitos de *fouling* inorgânico e biológico nos sistemas de águas industriais, contribuindo para falha mecânica em diversos equipamentos industriais (COETSER, CLOETE, 2005).

Os gêneros das ferrobactérias mais comuns que causam problemas quando presentes na água são: *Sphaerotillus*, *Leptothrix*, *Crenothrix*, *Siderocapsa*, *Sideromonas* e *Gallionella ferruginea*. Os três primeiros gêneros se caracterizam pelo arranjo filamentoso de suas células, que são envolvidas por uma bainha helicoidal perpendicular ao eixo da célula, daí receberem também a denominação de bactérias com bainha, todas elas estão envolvidas na aceleração da oxidação de íons  $\text{Fe}^{2+}$  dissolvidos na água para íons  $\text{Fe}^{3+}$  que formam, então, o  $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , ou  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ , insolúveis e estes podem ficar aderidos em forma de tubérculos, com coloração castanho-amarelada ou alaranjada na paredes de tubos (GENTIL, 2011).

As bactérias do gênero *Gallionella* são unicelulares, retiformes ou encurvadas e segregam um filamento longo (apêndice), em forma de fitas entrelaçadas, a partir do hidróxido férrico depositado na célula, dissolvem-se em ácidos fortes e quando se desprendem, aumentam a quantidade de sólidos em suspensão, como na água de refrigeração (VIDELA, 2003).

A presença de ferrobactérias em águas de abastecimento de tanques e reservatórios pode ocasionar aspecto, sabor e odor desagradáveis (decorrentes da decomposição bacteriana). Estas bactérias também estão associadas com a formação de tubérculos e corrosão de superfícies metálicas (BEECH *et al.*, 1999).





alteração da superfície e criação de um ambiente favorável à adesão de outros micro-organismos em fases posteriores, através da excreção de material polimérico extracelular (MPE). Dentre os micro-organismos que podem participar de processos de adesão estão: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus* sp e *Enterococcus faecium* (CRIADO, *et al.*, 1994; ANDRADE *et al.*, 1998; LERICHE, CARPENTIER, 1995). Micro-organismos patogênicos como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* também podem estar envolvidos nestes processos (LERICHE, CARPENTIER, 1995; SMITH, FRATÂMICO, 1995; SURMAN *et al.*, 1996).

Estas bactérias podem não causar problemas quando estão livres, mas a formação de um biofilme as aproxima e permite que a secreção de um sinal molecular potencialize os efeitos do metabolismo destas, podendo influenciar na corrosão de superfícies metálicas. *Pseudomonas aeruginosa* é um exemplo de micro-organismo que tem sua virulência aumentada quando está associado a um biofilme e este fator está diretamente ligado a sinais moleculares conhecidos como *Quorum sensing* (QS) (RAMPIONI *et al.*, 2007). Existem vários sistemas regulatórios na fisiologia do grupo das *Pseudomonas* sp e um dos principais é o sistema de regulação LasRI (HEURLIER *et al.*, 2006; BASSLER, 1999).

Os níveis de sinais moleculares QS são diferentes para *Pseudomonas* sp de vida livre e em biofilmes (CHOPP *et al.*, 2003), alguns modelos de formação de biofilmes indicam que as concentrações destes sinais e o metabolismo dos micro-organismos envolvidos no processo possui alterações metabólicas (ANGUIGE *et al.*, 2006; CHOPP *et al.*, 2003).

#### **2.1.5.1 Bacillus**

As espécies de *Bacillus* são de natureza ubíqua e colonizam o solo, a água e o pó do ar. Além disso, podem ser parte da microbiota intestinal normal do homem e de outros animais (KONEMAN *et al.*, 2008).

A maioria das espécies desse gênero são saprófitas. Entretanto, algumas espécies são oportunistas ou patógenos obrigatórios de humanos e outros animais.

Os principais habitats são solos de todos os tipos (pH de ácido a alcalino, temperatura de quente a fria, e fértil a desértico), colunas de águas e fundos depósitos de água doce ou salgada (MURRAY *et al.*, 2003).

#### **2.1.5.2 Enterobactérias**

Bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae estão amplamente dispersas na natureza e podem ser encontradas em solo, água, plantas e no trato digestório de humanos e outros animais (KONEMAN *et al.*, 2008).

Algumas espécies ocupam nichos ecológicos limitados, como *Salmonella typhi*, presente somente em humanos. Outras, como *Klebsiella pneumoniae*, estão bem distribuídas no ambiente, contribuindo para processos bioquímicos e geoquímicos. Além disso, esse grupo possui importância clínica devido ao fato de ser responsável por um grande número de infecções em humanos (MURRAY *et al.*, 2003).

#### **2.1.5.3 Pseudomonas**

*Pseudomonas* sp é uma bactéria Gram-negativa mundialmente distribuída, com preferência por ambientes úmidos. É encontrada na água, no solo e em plantas, incluindo vegetais e frutas (algumas espécies são muito conhecidas por serem fitopatógenos). Micro-organismos desse grupo possuem a habilidade de sobreviver em ambientes aquosos, particularmente *P. aeruginosa*, que pode ser encontrada em piscinas e em tubulações (MURRAY *et al.*, 2003)

#### **2.1.6 Fungos**

Os fungos são micro-organismos eucariotos, capazes de crescer sobre todos os substratos e ambientes, desde rochas (WARSCHEID, BRAAMS, 2000), superfícies metálicas, e até sobre e no interior de diversas espécies de plantas. Muitos são capazes de metabolizar compostos orgânicos como madeira, tinta, papel e polímeros de borracha (GÖRS *et al.*, 2007), produzindo solventes orgânicos como ácidos e álcoois que favorecem a biocorrosão.

## 2.2 Biocidas

O controle efetivo de biofilmes indesejáveis pode ser alcançado pela compreensão do tipo e natureza da contaminação sobre a superfície (carboidratos, gordura, proteínas, sais minerais) e os micro-organismos envolvidos na colonização desta superfície. Além disso, a seleção de biocidas e sanitizantes depende da sua eficácia, segurança ao aplicador e meio ambiente, e fácil remoção. Deve-se observar a natureza corrosiva do produto para que este não amplifique a deterioração da superfície colonizada por micro-organismos (SIMÕES *et al.*, 2010).

A terminologia “Bio-cida” se refere respectivamente a “vida+matar um”. Desta maneira trata-se de um agente para destruir ou eliminar um ser vivo. O composto a ser utilizado pode ser: desinfetante (aplicado sobre objetos inanimados destruindo organismos e micro-organismos, exceto esporos), preservante (composto empregado para evitar a biodeterioração de produtos ou materiais), agente químico esterilizante (destrói todas as formas de vida inclusive os esporos) ou agente antimicrobiano (substância ou mistura de substâncias usadas para destruir ou suprimir o crescimento indesejado de micro-organismos sobre superfícies inanimadas) (SONDOSSI, 2004). Os mecanismos de ação dos biocidas sobre os micro-organismos depende principalmente da estrutura celular destes pois geralmente atuam sobre: interação com componentes extracelulares, interação com membrana citoplasmática e interação com constituintes do citoplasma (MORENTE *et al.*, 2013).

A interação com componentes extracelulares pode ocorrer de diversas maneiras, um exemplo é a alteração da hidrofobicidade da parede celular ou membrana, normalmente este tipo de interação ocorre para permitir que ocorra a fragilização da célula e consequentemente morte celular. Este tipo de estratégia é utilizada na conjugação de mais de um tipo de agentes de controle microbianos, exemplo a utilização de compostos catiônicos para interagir com as cargas negativas presentes na parede celular bacteriana e membrana externa (GILBERT, MOORE, 2005). Outro tipo de interação é o mecanismo de ação do hipoclorito, que induz a lise celular em bactérias Gram-negativa devido ao seu caráter oxidante, além deste existem detergentes aniônicos com sódio lauril-sulfato que também induz a lise celular em bactérias gram-negativas (MORENTE *et al.*, 2013).

Os mecanismos de interação com a membrana citoplasmática podem ocorrer de várias maneiras e são em geral um dos principais mecanismos de ação de biocidas, podem realizar destruição física da membrana, interferência na permeabilidade seletiva da membrana, inibição da atividade enzimática associada à membrana (MORENTE *et al.*, 2013; SIVARAMAN *et al.*, 2003; GILBERT, MOORE, 2005). A utilização de sais quaternários de amônio atua na interação com a membrana citoplasmática e induz extravazamento de conteúdo intracelular através da perturbação da bicamada de fosfolipídeos, consequentemente alterando o controle osmótico da membrana, respiração e construção da membrana (WOODWARD, 2012; MORENTE *et al.*, 2013). Outro exemplo de biocida com ação ligada a dissolução da membrana são os álcoois tais como etanol e isopropanol. Os compostos citados também podem atuar na inibição de enzimas presentes na membrana plasmática, podendo interferir por exemplo no processo de respiração celular, síntese de membrana, permeabilidade seletiva. Um exemplo disto é a utilização de triclosan que pode modificar a estrutura da membrana e função, este efeito pode ser consequência da inibição da produção de ácidos graxos, que afeta diretamente a produção de fosfolipídeos, lipopolissacarídeos e lipoproteínas (SCHWEIZER, 2001; NACE, 2006).

A ação de biocidas sobre constituintes do citoplasma pode ocorrer através da interação com ácido nucleico, ribossomos, além de alterações em várias enzimas. Normalmente os biocidas utilizados não possuem como alvo estes constituinte, mas devido à penetração no citoplasma e alterações físico-químicas do citoplasma, estes compostos podem alterar de forma reversível ou irreversível as funções destas moléculas (MORENTE *et al.*, 2013). Alguns compostos interagem com grupos amino, sulfidrilas e hidroxilas, além disso existem as interações por exemplo de ozônio reagindo com aminoácidos e modificações de purinas e pirimidinas. Geralmente os compostos que penetram através da membrana citoplasmática possuem baixo peso molecular, outros exemplos de compostos são peróxido de hidrogênio, ácido peracético e compostos halogenados (FINNEGAN *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de mecanismos de resistência a antimicrobianos não é totalmente claro, mas recentemente vários estudos têm apresentado uma grande variedade de modelos e explicações para os fatores que influenciam a resistência dos micro-organismos aos agentes antimicrobianos (SIMÕES *et al.*, 2010; BAUER,

ROBINSON, 2002; SONDOSSI, 2004; MAH, O'TOOLE, 2001; MORENTE *et al.*, 2013).

Existem múltiplos mecanismos envolvidos na resistência exibida pelos biofilmes, cada um deles contribuindo para a sobrevivência do grupo e melhor adaptação ao meio ambiente onde estão inseridos. Os fatores variam de acordo com as bactérias presentes no biofilme, tipo de antimicrobiano (biocida) a ser utilizado, concentração do biocida, *design* do equipamento e condições de operação (MAH, O'TOOLE, 2001; SIMÕES *et al.*, 2010; EGUÍA *et al.*, 2008a; HÉQUET *et al.*, 2011). Cada um destes mecanismos formam barreiras físicas e químicas a penetração do antimicrobiano no biofilme que devido à junção destes fatores passa a possuir um “fenótipo próprio” que deve ser avaliado para que a melhor estratégia possa ser empregada e efetivamente controlar o biofilme.

Cada agente antimicrobiano pode ser aplicado em um determinado tipo de biofilme, portanto existe a necessidade de se realizar estudos prévios para se conhecer o tipo de “contaminação” (adesão) que ocorre sobre a superfície a ser tratada (QUADRO 2).

**Quadro 2 – Antimicrobianos aplicados ao controle de biofilmes formados por bactérias encontradas normalmente em indústria de processamento do leite**

<i>Tratamento</i>	<i>Tipo de Biofilme</i>
<b>Ozone, commercial chlorinated sanitizer</b>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>Alcaligenes faecalis</i>
<b>Benzalkonium chloride, hexadecyl trimethylammonium bromide, sodium hypochlorite, peracetic acid, hydrogen peroxide, o-cresol, phenol</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>Chlorine, peracetic acid, peroctanoic acid</b>	<i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Pseudomonas</i> sp biofilme composto
<b>Chlorine dioxide containing sanitizer</b>	<i>Bacillus cereus</i> / <i>P. fluorescens</i> separadas e em biofilme composto
<b>Chlorine</b>	<i>E. coli</i>
<b>Chlorinated-alkaline solution; low phosphate buffer detergent. Dual peracid solution. Alkaline solution; hypochlorite</b>	<i>L. monocytogenes</i>
<b>Sodium hydroxide; commercial alkaline cleaner</b>	<i>Pseudomonas putida</i>
<b>Chlorine; ozone</b>	<i>P. fluorescens</i> , <i>Pseudomonas fragi</i> e <i>P. putida</i>
<b>Chlorine, hydrogen peroxide, ozone</b>	<i>L. monocytogenes</i>

Glutaraldehyde, ortho-phthalaldehyde, hexadecyl trimethylammonium bromide, sodium dodecyl sulfate, chlorine solution, sodium hydroxide	P. fluorescens
Sodium hydroxide; nitric acid	Espécies gerais
Chlorine, chlorine dioxide, commercial detergent	B. cereus e Pseudomonas sp
Sodium hypochlorite	Salmonella typhimurium
Peroxydes; quaternarium ammonium compounds, chlorine	L. monocytogenes
Hydrogen peroxide. Sodium dichloroisocyanurate.	Staphylococcus aureus
Peracetic acid	

Fonte: (SIMÕES *et al.*, 2010)

Alguns biocidas industriais aplicados para: tratamento de água, torres de resfriamento e sistemas de resfriamento de água de processo são apresentados no Quadro 3.

**Quadro 3 – Seleção de biocidas industriais**

<i>Princípio químico ativo</i>	<i>Aplicações</i>
<b>Alkenyl (C12-C18) dimethyl ammonium bromide</b> <b>Alkyldimethylbenzyl ammonium chloride</b> <b>Bis(tributyltin)oxide</b> <b>Bis(trichloromethyl)sulphone</b>  <b>Bromine-yielding chemicals:</b> Sodium bromide, NaBr (deve ser ativado por agente oxidante, como NaOCl, Cl <sub>2</sub> e potássio peroxymono-sulfato), 1-Bromo-3-chloro-5,5-dimethylhydantoin <b>2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol</b>  <b>Chlorethylene bithiocyanate</b> <b>Chlorine/ Chlorine-yielding chemicals:</b> Chlorine (gás) Cl, NaOCl, Ca(OCl) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O, Na dichloro-s-triazinetrione/ trichloro-s-triazinetrione, 1-Bromo-3-chloro-5,5-dimethylhydantoin, 1-Bromo-3-chloro-5-methyl-5-ethylhydantoin, 1,3-Dichloro-5,5-dimethylhydantoin, Chlorine dioxide (ClO <sub>2</sub> ) <b>5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one + 2-methyl-4-isothiazolin-3-one</b> <b>Dialkyl methylbenzyl ammonium chloride</b> <b>2,2-Dibromo-3-nitrilopropionamide (20, 10 ou 50%) em polietileno glicol</b> <b>Diocetyl dimethyl ammonium chloride and ethanol</b> <b>Dodecylguanidine hydrochloride/hydro-chloride</b> <b>Gluta raldehyde (1,5-pentanedial)</b> <b>Hydrogen peroxide</b> <b>Methyl-2,3-dibromopropionate</b>	Papel e cellulose, resfriamento de água de processo Madeira, resfriamento de água de processo Madeira, resfriamento de água de processo Papel e celulose, resfriamento de água de processo, adesivos resfriamento de água de processo  Fluídos de Metalurgia, têxtil, resfriamento de água de processo resfriamento de água de processo resfriamento de água de processo  Madeira processada, fluídos de corte e refrigerantes, torre de resfriamento, lodo, papel e papelão Papel e celulose, madeira, resfriamento de água de processo Torre de resfriamento, papel e celulose, Fluídos de Metalurgia, recuperação de petróleo resfriamento de água de processo Papel e celulose, resfriamento de água de processo Fluído de Metalurgia, resfriamento de água de processo resfriamento de água de processo resfriamento de água de processo

<b>Methylene bis thiocyanate</b>	Lodo de papel, recirculação de sistema de água de resfriamento
<b>Mistura de compostos organo-sulfurados</b>	Torre de resfriamento, sistemas de lavagem de atmosfera
<b>Organotin, quaternaries, amines</b>	resfriamento de água de processo
<b>Ozone</b>	resfriamento de água de processo
<b>Polychlorophenates, alcohol e amines</b>	Torre de resfriamento e condensadores evaporativos
<b>Polychlorophenates, organosulfurs</b>	Torre de resfriamento
<b>Poly[hydroxyethylene (dimethyliminio)-ethylene (dimethy-liminio)] methylene dichloride</b>	Sistemas de águas industriais, resfriamento de água de processo
<b>Poly[oxyethylene (dimethyliminio)-ethylene (dimethyliminio)] ethylene dichloride</b>	resfriamento de água de processo, fluido de corte
<b>Potassium N-methyldithiocarbamate</b>	Papel e celulose, resfriamento de água de processo
<b>Sodium dimethyldithiocarbamate</b>	Papel e celulose, torre de resfriamento, fábrica de algodão, madeira e madeira processada, lubrificante de corte
<b>Tetrahydro-3,5-dimethyl-2H-1,3,5-thiadiazine-2-thione and blends</b>	Suspensões de argila, suspensões de titânio, adesivos, colas, látex, emulsões, caseína, Torre de resfriamento
<b>Tris(hydroxymethyl) nitromethane</b>	Emulsões de óleo em água, Papel e celulose, tratamento de água

Fonte: O autor, adaptado de (SONDOSSI, 2004)

Todos este compostos químicos são agrupados em dois grupos principais para classificação: agentes oxidantes e não-oxidantes. Os biocidas oxidantes são: Cloretos ( $\text{Cl}_2$ ), Dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ), Água sanitária ou Hipoclorito de sódio/cálcio, além destes existem compostos não-oxidantes tais como: sais quartenários de amônio, aldeídos, Isotiazolinonas, agentes quelantes e outros compostos (NACE 2006; WOODWARD, 2012). A seleção dos melhores compostos deve respeitar os níveis de concentração permitidos no ambiente onde serão utilizados, nível de toxicidade, velocidade de ação e tipo de material que deseja-se aplicar.

### 2.3 Corrosão Influenciada por Micro-organismos (CIM)

As perdas econômicas geradas pela corrosão influenciada por micro-organismos (CIM) nos revestimentos metálicos de tubulações não são oficialmente dimensionadas. Entretanto, dados oriundos de companhias individuais ou setores da indústria fornecem uma visão aproximada do problema (BEECH, GAYLARDE, 1999).

Segundo relatório da FHWA e NACE International (2002) sobre custo da corrosão e estratégias de prevenção nos Estados Unidos, o custo direta da corrosão representa 3,1% do PIB nacional, ou seja, segundo os dados coletados de 1998 de toda a cadeia industrial Norte Americana isto representa US\$ 276 bilhões. O mesmo



relatório mostra que os custos dos meios de combate à corrosão representam 1,38% do PIB nacional e representam US\$ 121 bilhões. Se fossem adotadas as técnicas de controle já conhecidas, estima-se que entre 25% a 30% dos custos totais da corrosão podem ser economizados, entre US\$ 69 e 82 bilhões (1% do PIB EUA) anualmente.

O custo direto da corrosão nos EUA no setor de energia elétrica (geração, transmissão e distribuição) é de US\$ 6,9 bilhões, divididos pelos principais fontes de energia norte-americana da seguinte maneira: US\$ 4,2 bilhões para energia elétrica geradas através de energia nuclear, US\$ 1,9 bilhões para corrosão em fontes de energia gerada por combustíveis fósseis, US\$ 0,15 bilhões para corrosão em usinas hidrelétricas e outras fontes e US\$ 0,6 bilhões para redes de transmissão e distribuição.

Ressalta-se que no Brasil este panorama apresenta-se de forma diferenciada devido ao nível de industrialização brasileiro e principalmente a diferenciada matriz energética, onde se tem a principal fonte de geração hidrelétrica e não termoeletrica nuclear e de combustível fóssil. Visto que no Brasil a ABRACO - *Associação Brasileira de Corrosão*, órgão que coordenada à área de Corrosão em geral no cenário nacional, utiliza-se destes índices apresentados acima como parâmetros para o dimensionamento dos custos da corrosão, fica difícil apresentar dados contextualizados à realidade brasileira, mas estes são suficientes para demonstrar em ordem de grandeza o custo em geral (ABRACO, 2012).

Quando se fala em custos da corrosão deve-se considerar: o custo direto corretivo ( $CD_c$ ), custo direto preventivo ( $CD_p$ ), custo indireto ( $C_{in}$ ).

Os custos corretivos ( $CD_c$ ) envolvem reparos, reposição de material, troca de equipamentos e peças. Já os custos preventivos ( $CD_p$ ) envolvem revestimentos, novas ligas e materiais resistentes à corrosão, inibidores de corrosão, investimentos em projetos e estudos preventivos. Para completar o dimensionamento da corrosão total ( $C_{tot}$ ) estão os custos indiretos ( $C_{in}$ ) que envolvem perdas de eficiência, prejuízos com interrupção de produção, deterioração de materiais, contaminação de produtos, multas e eventuais sanções legais devido às falhas mecânicas inerentes à

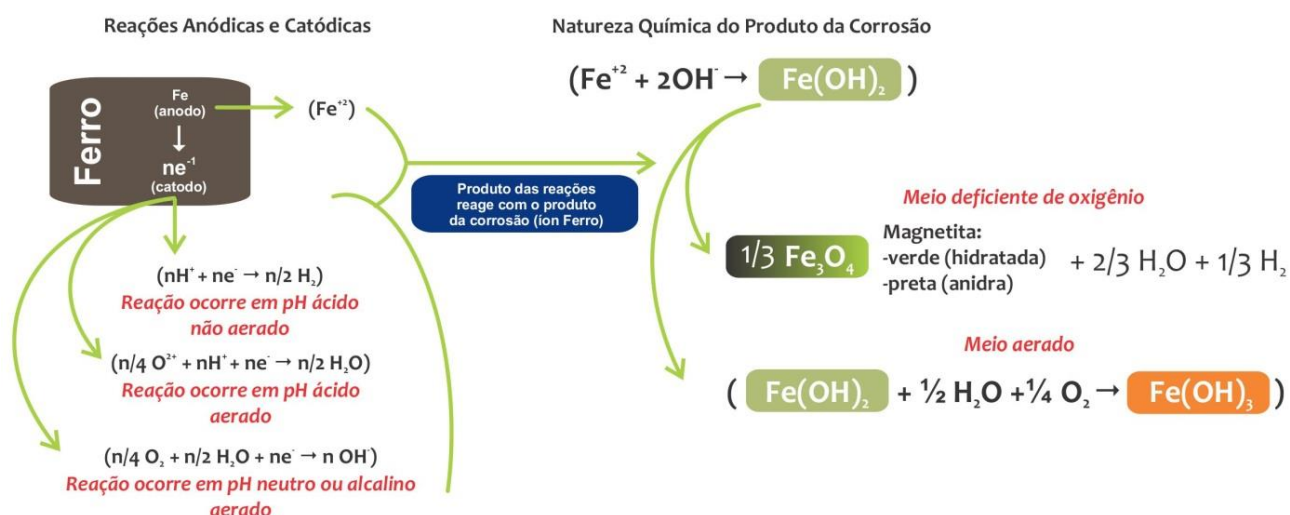
deterioração de superfícies, tubulações e equipamentos e suas consequências no ambiente onde se encontram.

De acordo com EPRI, *Electrical Power Research Institute* (GORMAN ET AL. 2001), o custo total ( $C_{\text{tot}} = CD_c + CD_p + C_{\text{in}}$ ) com a corrosão no setor de energia elétrica foi de US\$ 17,3 bilhões o que representa 2,5 vezes o valor apresentado no relatório da FHWA e NACE International (2002)

Diversos setores são afetados pela biocorrosão: indústrias em geral (naval, petroquímica, de bioprocessos, química, refinarias, etc.), tubulações enterradas, vedações de tanques de combustíveis em aviões e navios, usinas de geração de energia (termoelétricas, hidrelétricas, nucleares, etc.), mas estima-se que 20% da deterioração de superfícies metálicas são oriundas de processos biológicos associados a fatores eletroquímicos inerentes à corrosão (BEECH, GAYLARDE, 1999).

O isolamento e a identificação de micro-organismos envolvidos na biocorrosão de metais são importantes ferramentas para o entendimento do processo. A compreensão das relações existentes entre estes micro-organismos, conforme descrito anteriormente, e seu metabolismo dentro do biofilme fornecerá subsídios para que estratégias e um eficiente plano de controle possa ser determinado para reduzir seus efeitos, reduzindo, conseqüentemente, as perdas econômicas nos setores industriais e de produção de energia.

A corrosão ocorre de forma natural em superfícies metálicas mergulhadas, ou não, em líquidos e sob a influência de oxigênio (FIGURA 6). Os metais são normalmente encontrados na sua forma oxidada, com exceção dos metais nobres. A corrosão é um fenômeno eletroquímico de dissolução do metal em contato com outro meio (ar, água, etc.) (COETSER, CLOETE, 2005; DINH *et al.*, 2004).



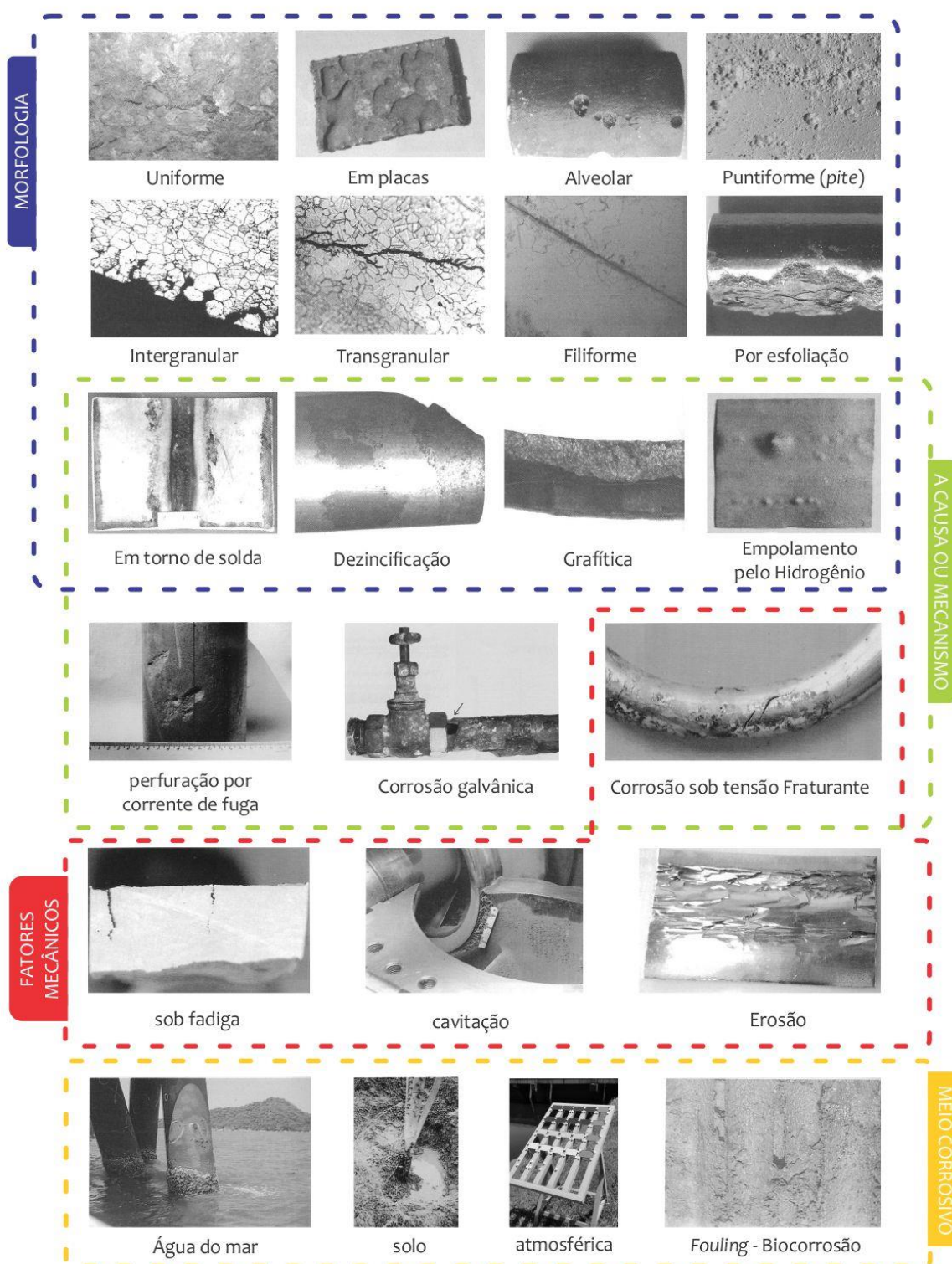
**Figura 6 - Corrosão Abiótica, sem influência de micro-organismos**

Fonte: Autor

De acordo com o meio corrosivo e o material podem ocorrer diferentes mecanismos para os processos corrosivos: eletroquímico e químico. No primeiro ocorrem reações químicas que envolvem transferência de carga ou elétrons através da interface ou eletrólito, já no mecanismo químico ocorrem reações diretas entre o material e o meio corrosivo, não havendo geração de corrente elétrica (GENTIL, 2011).

Segundo Gentil (2011) a corrosão pode ocorrer sob diferentes formas e estas podem ser apresentadas considerando-se a aparência ou forma de ataque e as diferentes causas da corrosão e seus mecanismos (Figura 7).

## CLASSIFICAÇÃO DA CORROSÃO



**Figura 7 - Classificação da Corrosão segundo morfologia, forma de ataque e seus mecanismos**

Fonte: Autor, adaptado (GENTIL, 2011).

A corrosão microbiológica, ou biocorrosão, é o processo eletroquímico de dissolução metálica iniciada ou acelerada por micro-organismos. Denomina-se genericamente *fouling*, ou acumulação, a formação de depósitos sobre a superfície de equipamentos. Esses depósitos têm como efeito negativo uma importante diminuição da eficiência e da vida útil do equipamento.

### **2.3.1 Micro-organismos envolvidos com a Corrosão Influenciada por Micro-organismos**

Os micro-organismos encontrados nos biofilmes depositados sobre os metais, podem atuar de diferentes maneiras na CIM. São eles as enterobactérias, bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, bactérias redutoras de sulfato (BRS), bactérias oxidantes do ferro e bactérias oxidantes do enxofre, e fungos filamentosos. A detecção de micro-organismos associados à corrosão normalmente está condicionada ao seu isolamento, culturas puras e identificação. Porém, em alguns casos são necessárias condições especiais para seu isolamento, dificultando sua identificação (DALY *et al.*, 2000). As BRS são um exemplo claro desta limitação, já que são anaeróbicas estritas e exigem ausência total de oxigênio (MARANGONI *et al.*, 2013a; MARANGONI *et al.*, 2013b).

Com a utilização de técnicas de biologia molecular pode-se acelerar o processo de detecção destes micro-organismos. Utilizando-se o DNA total extraído de amostras de corrosão (tubérculos), coletados das superfícies metálicas, tanto de corpos de provas (CP's) quanto de equipamentos, e iniciadores específicos, através de PCR (*Polimerase chain reaction*) amplifica-se o fragmento alvo que irá detectar a presença do micro-organismo na amostra. Esta técnica permite determinar qual tipo de bactéria está envolvida na corrosão que está danificando os equipamentos. E muito importante, em um menor tempo para se obter resultados (DEVEREUX *et al.*, 1992; MARANGONI *et al.*, 2013b).

### **2.3.2 Reservatório de usinas hidrelétricas, formação do reservatório e potenciais dificuldades**

Em relação às características das águas, estas dependem do tipo de afluentes, do material geológico que constitui a base do reservatório, da proximidade

do reservatório de zonas industriais, habitadas ou de produção agrícola e das condições climáticas. Em zonas tropicais e subtropicais ou, em geral, de grande vegetação, graves problemas podem surgir durante os anos iniciais de vida do reservatório de usinas Hidrelétricas. O principal problema é representado pelos processos de degradação do material orgânico, que gera altas concentrações de  $H_2S$  (ácido sulfídrico), devido ao processo de submersão que esta vegetação é submetida quando está se formando o reservatório. Estes tipos de fenômenos fazem com que as águas dos reservatórios alterem sua composição, por exemplo, aumento na concentração de ácidos fúlvicos, crescente emissão de metano e/ou aumento na concentração de ácido sulfídrico. Somada às variações periódicas anuais e dependendo da região climática onde se encontra situada a usina Hidrelétrica, o processo de degradação é agravado (MACIEL, 1982).

Segundo Roske *et al.* (2012) existe uma grande diferença no número de micro-organismos e a biodiversidade quando analisados reservatórios e principalmente os sedimentos destes de acordo com a profundidade (RÖSKE *et al.*, 2008). Este tipo de análise pode auxiliar no desenvolvimento de projetos de reservatórios e dessa forma minimizar os efeitos da bioincrustação, consequência da presença de matéria orgânica em sistemas submetidos a águas naturais.

## **2.4 Técnicas moleculares**

A utilização da biologia molecular como ferramenta para a investigação da ocorrência e distribuição de micro-organismos no ambiente apresenta uma vantagem em relação às técnicas microbiológicas convencionais. Ao serem empregadas podem apresentar um perfil detalhado da comunidade onde estão inseridos os micro-organismos de interesse, ao invés de apenas fornecer dados sobre uma pequena fração do biofilme (DALY *et al.*, 2000).

A análise fenotípica baseia-se na caracterização morfológica e/ou bioquímica e permite a caracterização do micro-organismo até o nível de gênero ou, em alguns casos, ao nível de espécie, porém existem algumas limitações. As técnicas moleculares, por outro lado, auxiliam na diferenciação dos grupos de micro-organismos, fornecendo informações diretas do DNA do indivíduo. Dessa forma, a

biologia molecular vem sendo utilizada para diferenciação de indivíduos e caracterização filogenética dos micro-organismos de interesse (STRINGARI, 2004).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é hoje uma tecnologia com inúmeras aplicações, tanto em pesquisa básica como aplicada. Por meio da PCR, pode-se, a partir de uma única molécula de DNA, gerar 100 bilhões de moléculas similares em algumas horas (MULLIS, FALOONA, 1987). A PCR é um método “*in vitro*” para amplificação de material genético. Isto ocorre porque através de uma pequena quantidade de ácido nucleico obtém-se uma grande quantidade de um fragmento específico de DNA, de tamanho e sequência definidos (ZANGENBERG *et al.*, 1999; MULLIS, FALOONA, 1987; SAIKI *et al.*, 1988).

A PCR é uma ferramenta composta basicamente de dois oligonucleotídeos sintéticos, cada um complementar às sequências das fitas opostas do DNA alvo em posições justamente flanqueadoras das extremidades do segmento a ser amplificado. Possui grande sensibilidade devido à possibilidade de se amplificar quantidades mínimas de ácido nucleico, os oligonucleotídeos iniciadores (*primer*) auxiliam a iniciação da replicação das cópias do fragmento alvo, com a extremidade 3'-OH das sondas hibridizadas uma em direção oposta a outra e posicionadas para moldar a síntese de DNA através do DNA molde (LANE *et al.*, 1985).

A partir do conceito básico de PCR, são vários os desdobramentos possíveis da metodologia quando associadas a outras ferramentas moleculares, como: detecção de genes em um DNA genômico, sequenciamento, quantificação de sequências específicas, análise de expressão gênica pela amplificação a partir de mRNA; análise da estrutura de genomas; análise de interações DNA-proteína; evolução molecular; identificação de mutações, novos membros de famílias multigênicas e de polimorfismo; diagnóstico de patógenos e de doenças hereditárias; identificação de anormalidades cromossômicas; mutações somáticas específicas e terapia gênica (BRASILEIRO, CARNEIRO, 1998; NEIVA, 2007).

As tecnologias de marcadores moleculares estão evoluindo rapidamente e atributos como consistência, tempo de obtenção de resultados, nível de polimorfismo obtido, custo e facilidade de uso são importantes para a escolha de uma técnica

adequada. Os ácidos ribonucleicos ribossomais (RNAr) são considerados os biopolímeros mais indicados para estudo de diversidade, pois seus genes são universalmente distribuídos e apresentam elevado grau de conservação. Sua variabilidade pode apresentar-se em maior ou menor extensão, em diferentes regiões da molécula (LANE *et al.*, 1985; NEIVA 2007).

A ribotipagem pode ser utilizada tanto para fungos quanto para bactérias, mas cada uma possui um alvo específico para detecção de variabilidade genética. Nos fungos são analisadas as regiões inter-espçadoras “ITS1” e “ITS2”, que estão situadas entre os genes 18S, 5S e 28S. Em bactérias as regiões conservadas são os genes 16S e 23S, portanto para análise de variabilidade amplifica-se a região intergênica 16-23S, que é variável (BRASILEIRO, CARNEIRO, 1998).

Para identificar micro-organismos e suas relações filogenéticas pode-se associar as tecnologias de PCR e sequenciamento de ácidos nucléicos. Dessa forma pode-se realizar a identificação de fungos e bactérias de forma mais rápida e, principalmente, de micro-organismos não cultiváveis ou de metabolismo extremamente exigente, como por exemplo bactérias redutoras de sulfato (DEVEREUX *et al.*, 1996). Neste caso específico, utilizando-se o DNA total extraído de amostras de corrosão (tubérculos), coletados das superfícies metálicas, tanto de corpos de provas (CP's) quanto de equipamentos, e, por meio de PCR (*Polimerase chain reaction*) com oligonucleotídeos iniciadores específicos, é possível detectar a presença do micro-organismo na amostra, com a amplificação do fragmento de DNA alvo. Esta técnica permite determinar quais gêneros ou até mesmo espécies envolvidos na corrosão, responsável por danos nos equipamentos (DEVEREUX *et al.*, 1992).

Existem várias metodologias para se detectar a variabilidade genética presente em amostras, algumas quantitativas e outras qualitativas. A utilização de *primers* específicos, sondas marcadas com fluorescência, enzimas de restrição, análise de plasmídeos, têm possibilitado a evolução destas metodologias. Para quantificar um determinado micro-organismo pode ser utilizada a PCR em tempo real (*Real-time PCR*), já sua identificação pode ser realizada via Nested-PCR ou Ribotipagem, utilizando as regiões intergênicas de bactérias (16S-23S) ou regiões



inter-espaçadoras em fungos (ITS1 e ITS2) (DEVEREUX *et al.*, 1992; DALY *et al.*, 2000; NEIVA, 2007).

A utilização do sequenciamento de regiões intergênicas 16S-23S (ITS) baseia-se na existência de sequências altamente conservadas nos genes DNAr da subunidade menor dos ribossomos (RNAr 16S) de todas as bactérias e sequências intersticiais variáveis nessas moléculas, as quais são espécie-específicas. A molécula de RNAr 16S é encontrada em todas as bactérias e tornou-se padrão universal para a sua identificação e classificação. A amplificação, por PCR, de sequências de DNA complementares a sequências variáveis do DNAr 16S de um micro-organismo desconhecido e sua comparação com sequências variáveis do RNAr 16S de espécies conhecidas, fornece informação suficiente ou para identificá-lo como membro de uma espécie ou grupo conhecido ou classificá-lo como uma nova espécie (NEIVA, 2007).

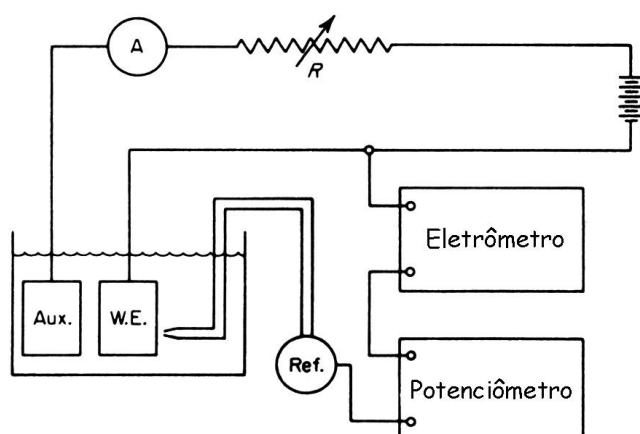
No caso da análise de diversidade intraespecífica, em que existe elevado grau de semelhança genética entre os indivíduos, o fragmento amplificado deve incluir o espaço intergênico 16S-23S DNAr. Esta região apresenta maior variabilidade, tanto em sua composição de bases quanto em seu tamanho, quando comparada com a 16S ou 23S DNAr (REIS JUNIOR *et al.*, 2006).

## **2.5 Avaliação da adesão de micro-organismos utilizando ferramentas eletroquímicas**

A potenciometria é uma técnica bem conhecida dos químicos, sendo os eletrodos íon-seletivos, somente uma pequena parte deste campo da eletroanalítica. A base da potenciometria foi estabelecida por Nernst, em 1888, descrevendo a origem do potencial de eletrodo entre um metal e uma solução contendo íons deste metal, e o potencial redox entre um metal inerte e uma solução contendo um sistema redox (FERNANDES *et al.*, 2001).

Os estudos para compreender a corrosão conduzem, entre outros resultados, a técnicas de laboratório que permitem realizar estes ensaios em forma muito mais rápida e confiável. A teoria dos potenciais mistos é a base dos métodos eletroquímicos utilizados para determinar a velocidade de corrosão. Alguns dos métodos mais comuns são a extrapolação de Tafel, a polarização linear e a espectroscopia de

impedância eletroquímica. O método da extrapolação de Tafel para determinação da velocidade de corrosão utiliza os dados obtidos de medições de polarização catódica ou anódica (ASTM, 2010b; ASTM, 2009; ASTM, 2010a). Existe uma preferência para os dados de polarização catódica, pois na maioria dos casos os metais possuem uma camada de óxido sobre sua superfície e as equações de Tafel foram desenvolvidas para um metal sem recobrimento sobre sua superfície, diretamente em contato com a solução. Na condição de polarização catódica, pode-se assumir mais facilmente que o metal não possui nenhum recobrimento. Um diagrama esquemático da experiência de medição de uma curva de polarização catódica é mostrado na Figura 8. Utiliza-se um equipamento eletrônico comandado por um microcomputador e com um programa especialmente desenvolvido, de forma que as medições são completamente automáticas (HUECK, 1968; GENTIL, 2011; ASTM, 2010A; ASTM, 2009; ASTM, 2008).



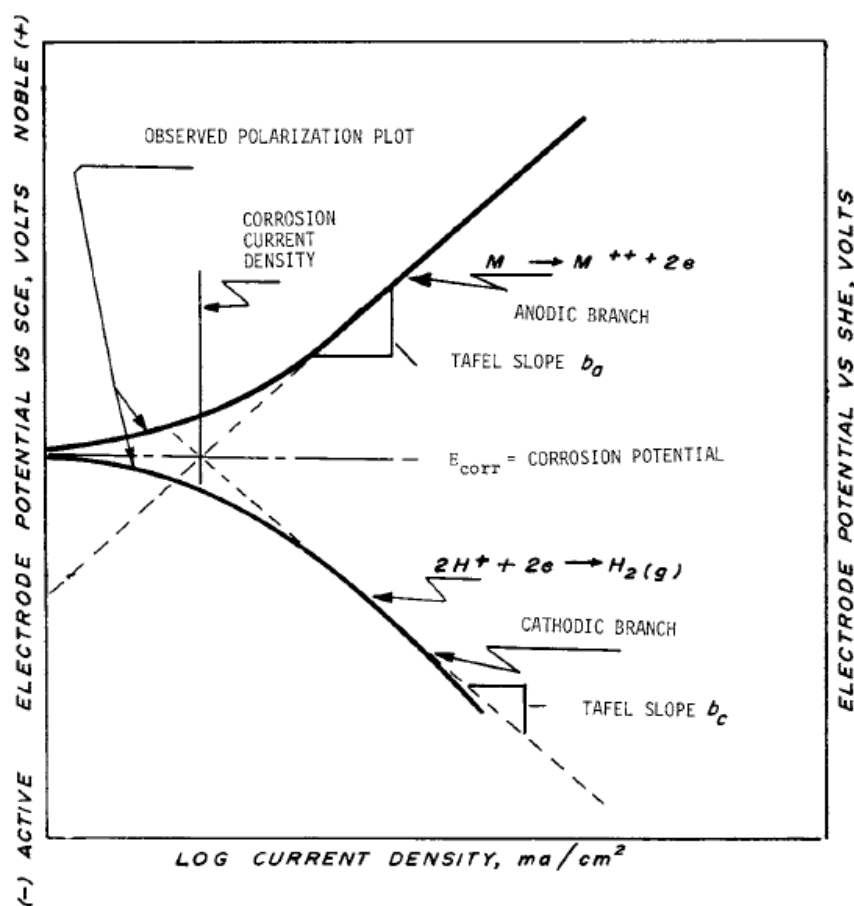
**Figura 8 - Circuito elétrico para medições de polarização catódica**

**Legenda: AUX: eletrodo auxiliar para passagem de corrente; W.E.: eletrodo de trabalho (objeto de estudo); REF.: eletrodo de referência (não circula corrente através dele).**

Fonte: Adaptado (ASTM, 2010b)

Considerem-se os resultados obtidos durante uma experiência de polarização catódica de um metal M imerso em uma solução ácida sem oxigênio. Antes de iniciar o experimento aplicando-se a corrente catódica, o voltímetro indicará o potencial de corrosão do corpo-de-prova em relação a um eletrodo de referência. Quando se representa o potencial do eletrodo contra o logaritmo da corrente aplicada se obtém

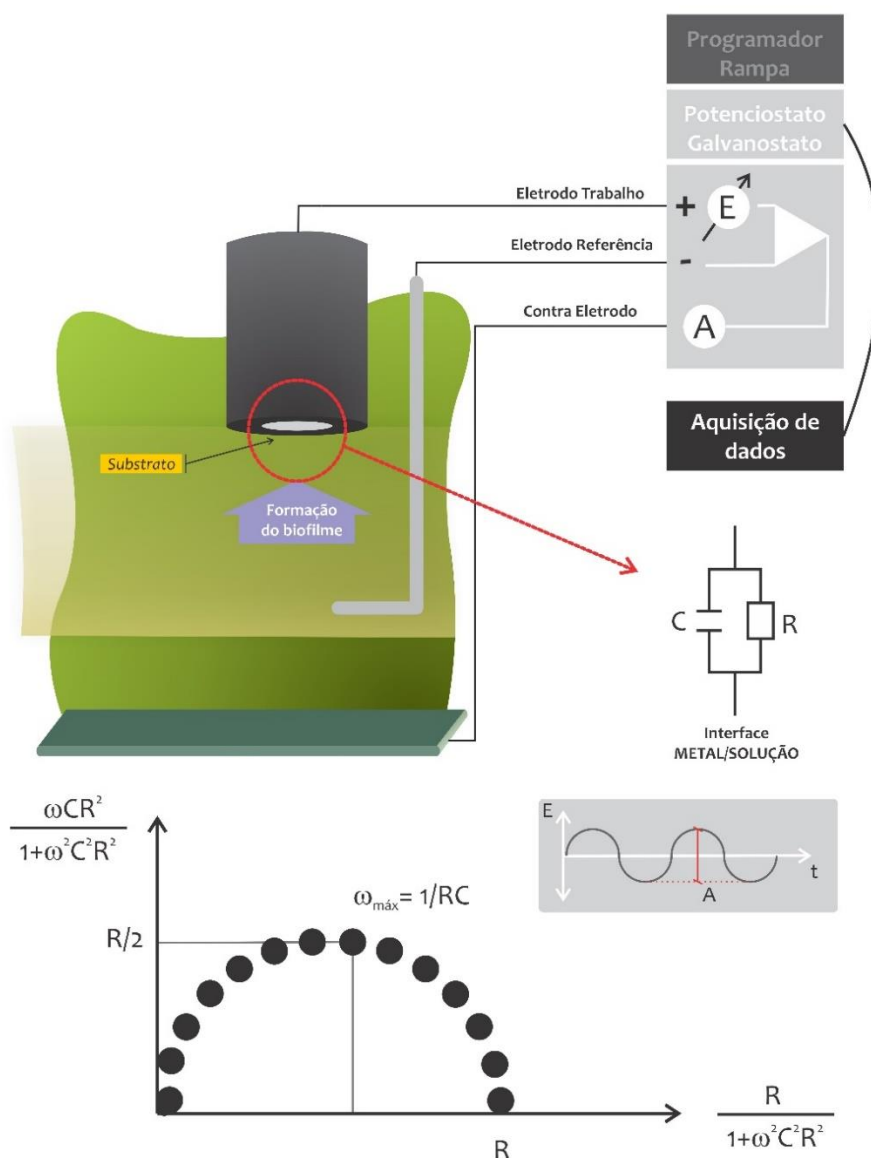
uma curva como a mostrada Figura 9. A curva de polarização experimental está representada por pontos unidos por uma linha contínua. A curva é não linear a baixos sobrepotenciais, mas a altos valores se obtém uma linha reta. A corrente aplicada é igual à diferença entre a corrente correspondente aos processos de redução e aquela que corresponde aos processos de oxidação ou dissolução do metal. A região linear corresponde à região de Tafel. Para determinar a velocidade de corrosão a partir desta medida, a região de Tafel é extrapolada até o potencial de corrosão. No mesmo, a velocidade de evolução de hidrogênio, ou oxigênio se o meio for aerado, é igual à velocidade de dissolução do metal, e este valor é a velocidade de corrosão do sistema expressada em termos de densidade de corrente (HUECK, 1968; GENTIL, 2011; ASTM, 2008; ASTM, 2010A; ASTM, 2009).



**Figura 9 - Representação do logaritmo da corrente aplicada a um eletrodo imerso em uma solução ácida sem ar versus o potencial medido contra um eletrodo de referência.**

Fonte: (ASTM, 2010b)

Abaixo segue esquema de utilização de eletrodos em experimentos para adesão de biofilme sobre metal e representações do arranjo experimental do potenciostato/galvanostato utilizados no trabalho. Além disso são apresentados os gráficos para obtenção de dados tais como a Resistência e Capacitância do biofilme formado sobre o eletrodo Figura 10.



**Figura 10 - Arranjo experimental de eletrodos e potenciostato/galvanostato utilizados em experimentos para adesão de biofilme**

Fonte: Autor, adaptado (GENTIL, 2011)

Atualmente grupos de pesquisa utilizam a integração de técnicas eletroquímicas aos estudos da adesão de micro-organismos em superfícies, muitos deles para utilização no desenvolvimento de sensores, que permitirão uma avaliação *on-line* da contaminação de superfícies imersas em sistemas naturais ou em contato com material orgânico (PIRES *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2004; LU *et al.*, 2013; TURNER, 2013; SU *et al.*, 2011; MARANGONI *et al.*, 2013c). Alguns utilizam sistemas que conectam microfluídica com análises de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica, “Electrochemical Impedance Spectroscopy – EIS”, e amperometria, utilizando eletrodos de ouro ou polímeros condutores (PIRES *et al.*, 2013). Alguns sensores utilizam escalas reduzidas de tamanho da superfície de análise ou utilizando nanopartículas depositadas sobre substrato para permitir a utilização de metais nobres na confecção de sensores (PAREDES *et al.*, 2013; REDDY *et al.*, 2011). A utilização de técnicas eletroquímicas de avaliação das alterações na interface metal solução, cultivos controlados de micro-organismos e associação de técnicas de avaliação químicas dos materiais aderidos sobre a superfície de eletrodos ou sensores, permite uma avaliação aprofundada dos mecanismos envolvidos na adesão de micro-organismos e formação de biofilmes sobre superfícies (BEN-YOAV *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2011; YANG, 2008; PIRES, *et al.*, 2013; MOON *et al.*, 2009; QUILÈS *et al.*, 2010; LORITE *et al.*, 2013; ASHOK *et al.*, 2011)

A interação de micro-organismos e superfícies pode ser analisada por técnicas analíticas, analisando os sinais da perturbação realizada pela presença destes e correlacionando com a concentração dos micro-organismos no local, para isto existem algumas técnicas para detecção, mas as principais são Eletroquímica, Ótica e Infra-vermelho, que são amplamente utilizadas no desenvolvimento de sensores (SU *et al.*, 2011)

São utilizados nos estudos de adesão de micro-organismos as técnicas amperométricas onde é aplicado um potencial entre o eletrodo trabalho e o referência e monitora-se o sinal de corrente que é correlacionado com a concentração dos compostos alvo que pretende-se monitorar. Para a utilização desta técnica, os sinais de corrente gerados dependem das espécies geradas por consequência das reações de oxidação e redução dos sítios ativos que pretende-se monitorar na superfície do eletrodo de trabalho (DING *et al.*, 2008).

As técnicas de condutivimetria dependem da alteração da condutividade da solução através da geração ou consumo de espécies iônicas. Esta técnica possui certo interesse no desenvolvimento de sensores pois permite a miniaturização dos sistemas, já que não exige a presença do eletrodo de referência (SHULGA *et al.*, 1994; LEI *et al.*, 2006). No entanto qualquer alteração de cargas no sistema, independentemente da presença das moléculas alvo pode ser interpretado como falso positivo, por este motivo o sistema acaba sendo considerado fraco quanto a seletividade, apesar de ser rápido e sensível (MIKKELSEN, RECHNITZ, 1989).

A utilização da potenciometria para desenvolvimento de biosensores envolve a medição da diferença de potencial entre os eletrodos trabalho e referência, além disso esta técnica mostra a concentração ao redor da zona de análise. Esta técnica necessita de eletrodos de referência e a seletividade e sensibilidade da técnica dependem da seletividade do eletrodo de trabalho, para uma correta utilização da ferramenta é necessário a manutenção da qualidade do eletrodo referência (BOBACKA *et al.*, 2008; LEI *et al.*, 2006).

Uma técnica eletroquímica versátil para estudos e análise em sensores é a voltametria, pois monitora tanto a voltagem quanto a corrente e é registrado ambos. A análise gráfica permite monitorar tanto o tipo de espécie química através da posição do pico de corrente, quanto a concentração de espécies devido à densidade da corrente de pico. Possui baixo nível de ruído, característica que aumenta a sensibilidade da utilização em biosensores, além disso permite a avaliação de múltiplos analitos em uma única detecção. Devido a etapa de pré-concentração, esta técnica se mostra como uma das mais sensíveis, mas também apresenta a desvantagem de se manter a qualidade do eletrodo de referência (WANG, 2008).

Os sensores baseados em amperometria são os mais divulgados na literatura, principalmente em aplicações ambientais (D'SOUZA, 2001; ROGERS, 2006; YAGI, 2007). Alguns trabalhos apontam a utilização de organismos ou enzimas fixados, por exemplo em eletrodos de pasta de carbono que podem ser aplicados potenciais para se obter a corrente como resposta e monitorar a presença de toxinas ou compostos químicos que deseja-se monitorar, para isto utiliza-se a redução ou oxidação dos materiais fixados na pasta (LEI *et al.*, 2006; LEI *et al.*, 2005; LEI *et al.*, 2007;

MULCHANDANI *et al.*, 2006). A utilização de sensores baseados em condutivimetria possui velocidade de resposta rápida e sensibilidade, por exemplo biosensor utilizando *Chlorella vulgaris* microalgae como receptor para detecção de metais pesados e pesticidas em amostras de água (CHOTEAU *et al.*, 2004; CHOTEAU *et al.*, 2005), um sensor parecido que foi desenvolvido para detecção de  $\text{Cd}^{2+}$  utilizando-se o mesmo organismo e o limite de detecção foi de 1ppb  $\text{Cd}^{2+}$  (GUEDRI, DURRIEU, 2008). Alguns exemplos de biosensores utilizando potenciometria são sensores para detecção de compostos como cefalosporinas, resíduos de  $\beta$ -lactâmico em leite, ou mesmo detecção de organismos contaminantes em alimentos tais como *Escherichia coli* (KUMAR *et al.*, 2008; FERRINI *et al.*, 2008; ÁVILA *et al.*, 2012; BETTAIEB *et al.*, 1991). A utilização de voltametria cíclica também é relatada na literatura, exemplo sensores para detecção de cobre, foi utilizada etapa de pre-concentração o que permitiu que os limites de detecção fossem abaixo de 54 nM  $\text{Cu}^{2+}$  (ALPAT *et al.*, 2008).

Os sistemas para cultivo de micro-organismos e avaliações via técnicas eletroquímicas são diversificados, normalmente os dispositivos são ajustados para atender finalidades específicas, ou seja, alguns dispositivos permitem a avaliação eletroquímica, outros a avaliação ótica, outros apenas o cultivo de micro-organismos com a finalidade de avaliação da atividade antimicrobiana. Os modelos experimentais e técnicas impregadas na avaliação da adesão de micro-organismos podem utilizar cultivos em fluxo sobre eletrodos de *Indium-tin-oxide* (ITO), com utilização de eletrodos referência e contra-eletrodo de platina (BAYOUDH *et al.*, 2008), este trabalho utilizou a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). Outro sistema que utiliza o ITO como eletrodo de trabalho e permite, além da análise de EIS, realizar avaliação da adesão dos micro-organismos via microscopia ótica, foi desenvolvido por Ben-Yoav *et. Al.* (BEN-YOAV *et al.*, 2011). Um exemplo de sistema para cultivo de micro-organismos para formação de biofilme e/ou análise de atividade antimicrobiana sem a utilização de avaliações por técnicas eletroquímicas é o reator de cultivo biológico *CDC Biofilm Reactor* (ASTM, 2012a; ASTM, 2012c).

O presente trabalho utilizou sistema de fluxo contínuo para o monitoramento da formação de biofilme bacteriano sobre superfície metálica, especificamente foram utilizados eletrodos de platina para o eletrodo de trabalho e contra-eletrodo, para o eletrodo de referência foi utilizado um fio de prata que funciona como *pseudo* eletrodo

de referência, já que a utilização de um eletrodo de referência Ag/AgCl em KCl poderia ser comprometido devido às modificações no cultivo, consequência do crescimento biológico. O objetivo da utilização do fio de prata como eletrodo de referência foi minimizar as interferências do cultivo microbiológico e contaminações sobre o referência, já que as análises de potenciometria dependem da manutenção deste eletrodo em perfeitas condições. Diversos trabalhos estudam os efeitos bactericidas de partículas de Prata sobre os micro-organismos (MOCANU *et al.*, 2014; RADZIG *et al.*, 2013; MIRZAJANI *et al.*, 2014). Íons de Prata podem atuar na inibição de enzimas respiratórias principalmente atuando nas espécies reativas com o oxigênio, além disso podem causar lesões no DNA, mas este mecanismo normalmente é recuperado pelos sistemas de reparo (RADZIG *et al.*, 2013). A toxicidade dos íons de Prata estariam relacionados às desordens no citoplasma dos micro-organismos, através do rompimento do ATP ou na replicação do DNA. Considera-se ainda que partículas de prata podem ancorar na parede celular de bactérias produzindo orifícios que permitem a penetração no citoplasma, além do acúmulo na parede aumentar a permeabilidade da membrana e consequente morte do micro-organismo (MOCANU *et al.*, 2014). Portanto a opção por fio de prata como eletrodo de referência no lugar da utilização de eletrodo de Ag/AgCl seria uma opção para inserção no sistema para avaliação da formação de biofilme através de técnicas potenciométricas.

## **2.6 Centrais Geradoras de Energia Elétrica - Brasil**

Centrais Geradoras Hidrelétricas produzem energia elétrica através do aproveitamento do potencial hidráulico existente em um rio. O Brasil possui o terceiro maior potencial elétrico do mundo através de Hidrelétricas, ficando atrás apenas do Canadá e dos Estados Unidos da América (ANEEL, 2014).

A energia elétrica é gerada na Central Geradora Hidrelétrica e lançada na rede de energia, que possui as cargas (pontos de consumo) e os geradores (pontos de produção). Os grupos geradores podem ser: Central Geradora Hidrelétrica (CGH), Central Geradora Eolielétrica (EOL), Pequenas Centrais Hidrelétricas (PCH), Central Geradora Solar Fotovoltáica (UFV), Usina Hidrelétrica de Energia (UHE), Usina Termelétrica de Energia (UTE) e Usina Termonuclear (UTN).



Atualmente o Brasil possui no total 3040 empreendimentos em operação, gerando 134 GW de potência (QUADRO 4). A previsão para os próximos anos é de um adicional de 36 GW na capacidade de geração do país, através de 148 empreendimentos atualmente em construção (QUADRO 5) e mais 544 outorgados (QUADRO 6).

**Quadro 4 – Centrais Geradoras de Energia Elétrica em Operação no Brasil**

TIPO	QUANTIDADE	POTÊNCIA OUTORGADA (kW)*	POTÊNCIA FISCALIZADA (kW)†	%‡
CGH	434	265.289	266.495	0,21
EOL	109	2.259.569	2.251.773	1,78
PCH	462	4.636.436	4.597.416	3,63
UFV	52	8.946	4.946	0
UHE	195	86.720.625	81.085.594	64,1
UTE	1.786	38.129.318	36.370.858	28,7
UTN	2	1.990.000	1.990.000	1,57
Total	<b>3.040</b>	<b>134.010.183</b>	<b>126.567.082</b>	<b>100</b>

FONTE: ANEEL (2014)

\*A Potência Outorgada é igual a considerada no ato de Outorga

†A Potência Fiscalizada é igual a considerada a partir da operação comercial da primeira unidade geradora

‡Os valores de porcentagem são referentes a Potência Fiscalizada.

**Quadro 5 – Centrais Geradoras de Energia Elétrica em Construção no Brasil**

TIPO	QUANTIDADE	POTÊNCIA OUTORGADA (kW)*	%†
CGH	1	848	0
EOL	91	2.290.674	11,55
PCH	31	344.013	1,73
UHE	7	14.060.800	70,91
UTE	17	1.783.230	8,99
UTN	1	1.350.000	6,81
Total	<b>148</b>	<b>19.829.565</b>	<b>100</b>

FONTE: ANEEL (2014)

\*A Potência Outorgada é igual a considerada no ato de Outorga

†Os valores de porcentagem são referentes a Potência Fiscalizada.

**Quadro 6 – Centrais Geradoras de Energia Elétrica Outorgadas que ainda não foram construídas no Brasil**

TIPO	QUANTIDADE	POTÊNCIA OUTORGADA (kW)*	%†
CGH	53	34.351	0,21
CGU	1	50	0
EOL	200	5.223.921	32,41
PCH	140	1.922.016	11,92
UHE	15	3.040.442	18,86
UTE	135	5.897.977	36,59
Total	<b>544</b>	<b>16.118.757</b>	<b>100</b>

FONTE: ANEEL (2014)

\*A Potência Outorgada é igual a considerada no ato de Outorga

†Os valores de porcentagem são referentes a Potência Fiscalizada.

A matriz energética brasileira compreende: hidrelétricas, termoeletricas (gás, petróleo, biomassa, nuclear e carvão mineral) e centrais geradoras eólica e solar, mas,

de todas estas fontes, 67,91% da produção brasileira é oriunda de hidrelétricas com apenas 1091 Centrais Geradoras do total de 3040 Centrais já instaladas (ANEEL, 2014).

O Quadro 7 exemplifica a capacidade de produção (MW) das principais Hidrelétricas do Brasil (ANEEL, 2014).

### **Quadro 7 – Centrais Geradoras de energia Elétrica do Brasil por região**

NOME DA USINA	LOCALIZAÇÃO	CAPACIDADE DE PRODUÇÃO (MW)*
<b>Região Norte</b>		
Tucuruí I e II	Rio Tocantins	8.370
Balbina	Rio Uatumã	250
Cana Brava	Rio Tocantins	450
<b>Região Nordeste</b>		
Paulo Afonso	Rio São Francisco	2.460
Sobradinho	Rio São Francisco	1.050
Moxotó	Rio São Francisco	439
Itaparica	Rio São Francisco	1.500
Xingó	Rio São Francisco	3.162
<b>Região Sudeste</b>		
São Simão	Rio Paranaíba	1.715
Água Vermelha	Rio Grande	1.396
Três Irmãos	Rio Tiête	808
Ilha Solteira	Rio Paraná	3.444
Porto Primavera	Rio Paraná	1.540
Jaguara	Rio Grande	426
Três Marias	Rio São Francisco	388
Cachoeira Dourada	Rio Paranaíba	658
Estreito	Rio Grande	1.050
Itumbiara	Rio Paranaíba	2.080
<b>Região Sul</b>		
Foz do Areia	Rio Iguaçu	1.676
Itaipu	Rio Paraná	12.600
Parigot de Souza	Rio Capivari	247
Itaúba	Rio Jacuí	625
Salto Osório	Rio Iguaçu	1.050
Machadinho	Rio Pelotas	1.140
Salto Santiago	Rio Iguaçu	1.420
<b>Região Centro-Oeste</b>		
Ilha Solteira	Rio Paraná	3.230
Itumbiara	Rio Paranaíba	2.080
Jupia	Rio Paraná	1.551

FONTE: ANEEL (2014)

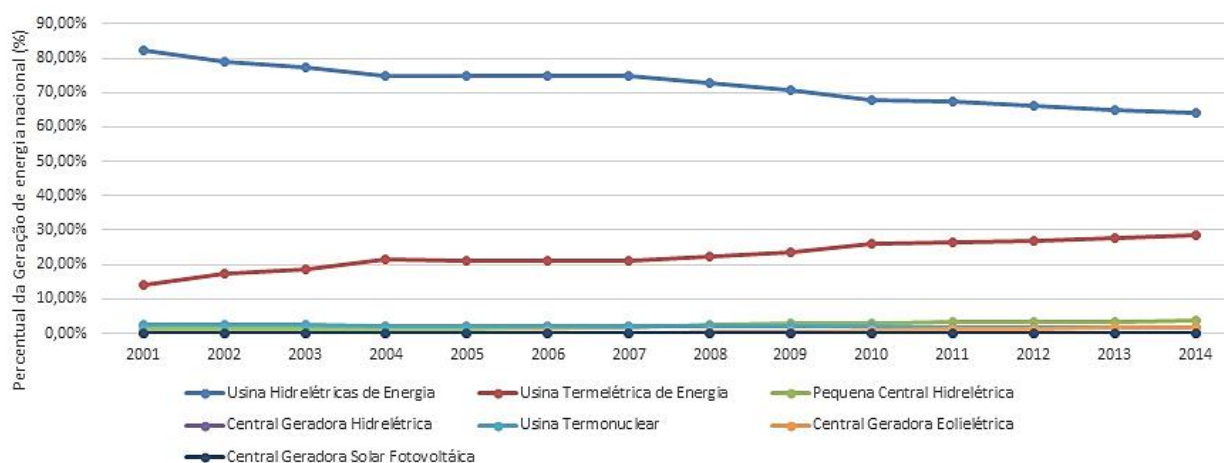
\*Os valores são referentes a Potência Fiscalizada.

A matriz energética brasileira possui uma grande diversificação e em sua maioria está baseada em fonte não poluentes e renováveis, segundo dados da ANEEL (2014), o Brasil possui 63,79% da fonte energética para geração de energia elétrica é oriunda de Hidro energia (Quadro 8 e Figura 11). Além da Hidrelétricas, no Brasil, as Termelétricas são responsáveis por uma grande parcela da energia despachada que corresponde à 26,99% (Figura 11). A Figura 12 mostra a evolução da demanda energética no Brasil e a evolução da produção nas diferentes fonte energéticas (ANEEL, 2014). Vale ressaltar que observando a Figura 11 e Figura 12 pode-se observar uma tendência de queda na produção de energia elétrica por hidro energia e um aumento proporcional na produção por Termelétricas e isto sob a ótica da sustentabilidade pode ser um sério problema, visto que em todo o mundo a tendência é a diversificação da matriz energética buscando-se soluções ecológicas e não mais poluentes. As fontes eólica e fotovoltaicas que poderiam ser alternativas interessantes para a complementação de hidro energia continuam inexpressivas mas com incentivos nos planos econômicos atuais.

**Quadro 8 - Matriz energética Brasileira por fontes de energia para produção de energia elétrica**

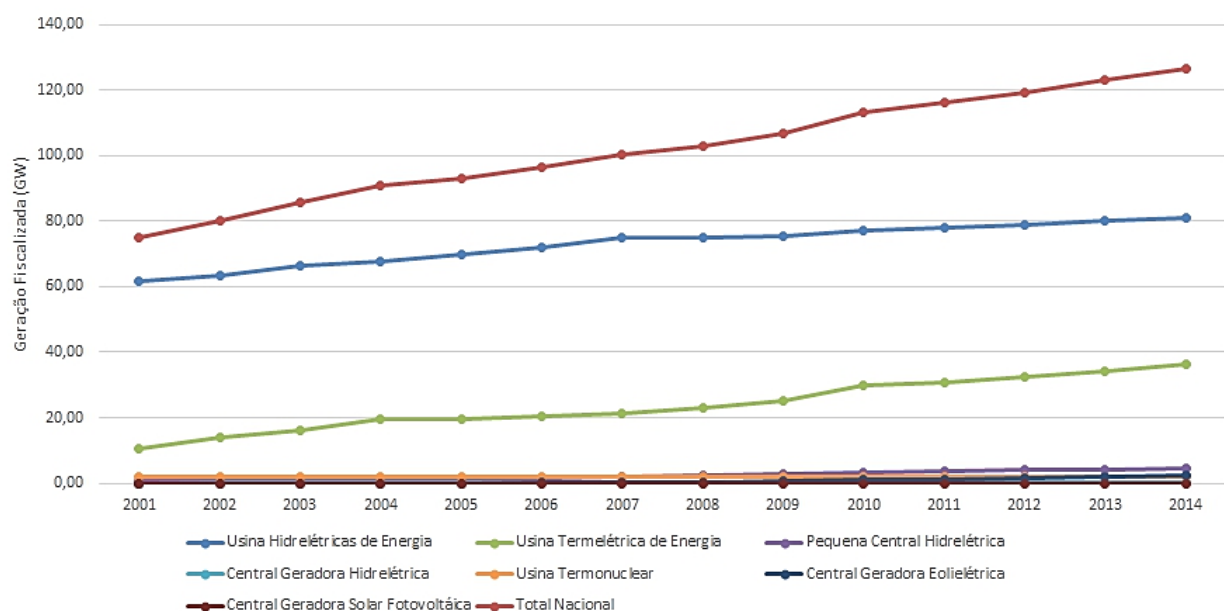
Empreendimentos em Operação							
Tipo		Capacidade Instalada		%	Total		%
		N.º de Usinas	(kW)		N.º de Usinas	(kW)	
Hidro		1.091	85.949.506	63,79	1.091	85.949.506	63,79
Gás	Natural	113	12.170.186	9,03	152	13.895.609	10,31
	Processo	39	1.725.423	1,28			
Petróleo	Óleo Diesel	1.110	3.522.286	2,61	1.144	7.671.899	5,69
	Óleo Residual	34	4.149.613	3,08			
Biomassa	Bagaço de Cana	378	9.339.426	6,93	475	11.409.535	8,47
	Licor Negro	16	1.530.182	1,14			
	Madeira	49	422.835	0,31			
	Biogás	23	80.659	0,06			
	Casca de Arroz	9	36.433	0,03			
Nuclear		2	1.990.000	1,48	2	1.990.000	1,48
Carvão Mineral	Carvão Mineral	13	3.389.465	2,52	13	3.389.465	2,52
Eólica		109	2.251.773	1,67	109	2.251.773	1,67
Fotovoltaica		52	4.946	0	52	4.946	0
Importação	Paraguai		5.650.000	5,46		8.170.000	6,06
	Argentina		2.250.000	2,17			
	Venezuela		200.000	0,19			
	Uruguai		70.000	0,07			
Total		3.040	134.737.083	100	3.040	134.737.083	100

Fonte: ANEEL (2014)



**Figura 11 - Histórico da diversificação da matriz energética brasileira**

Fonte: Autor, dados ANEEL (2014)

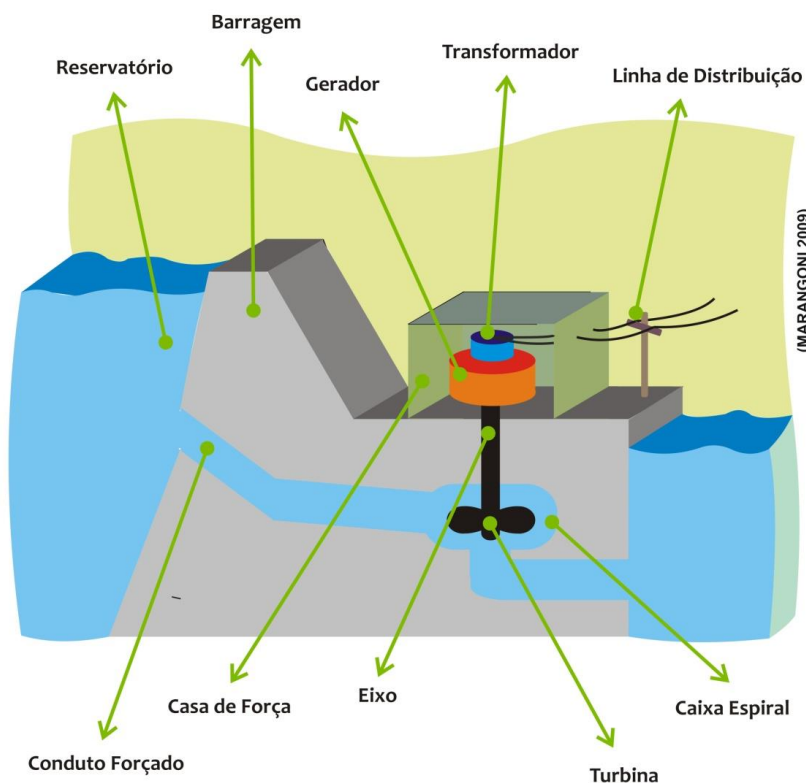


**Figura 12 - Histórico brasileiro de Geração de energia elétrica por tipo de fonte energética**

Fonte: Autor, dados ANEEL (2014)

### 2.6.1 Composição de Centrais Geradoras Hidrelétricas

As Centrais Geradoras Hidrelétricas são compostas basicamente pelo reservatório e casa de força, além destas duas estruturas existe a subestação elevadora e linhas de transmissão (FIGURA 13).



**Figura 13 – Representação em corte da construção civil de uma Central Geradora Hidrelétrica.**

Fonte: Autor

O **Reservatório** possui um volume útil que tem por objetivo regularizar a vazão do rio em uma determinada secção, dessa forma pode-se compensar períodos de estiagem, mantendo-se o volume necessário para a produção instalada. Quando a vazão do afluente é maior, aumenta-se a capacidade de se produzir uma maior quantidade de energia elétrica, respeitando a capacidade máxima de produção (ANEEL, 2014).

A **Casa de Força** é o local onde se encontram instalados os equipamentos da Central Geradora. As turbinas instaladas neste local, recebem através das adutoras (conduto forçado) o fluxo de água do reservatório e convertem a energia potencial hidráulica do rio em energia elétrica através do movimento das turbinas. O eixo do gerador é movimentado pelas pás da turbina e movimentam ímãs dentro do gerador, que irão gerar energia elétrica através do campo eletromagnético gerado dentro do fio bobinado no gerador (Estator) (QUITELA, 2007).

As turbinas dividem-se entre 4 tipos principais: Pelton, Francis, Kaplan e Bulbo. Cada uma delas é adaptada a determinada altura de queda, e a potência é produto da queda e da vazão volumétrica. O princípio de todas é semelhante, a água é levada à turbina através das adutoras (conduto forçado), dentro dela são movimentadas palhetas e, dependendo do tipo de turbina, existem sistemas móveis para aumentar ou diminuir potência. A água depois da passagem pela turbina é conduzida para o leito do rio a jusante da central hidrelétrica (QUITELA, 2007). São compostas pelas seguintes seções: *Caixa espiral*, *Pré-distribuidor*, *Distribuidor*, *Tubo de sucção*, *Rotor* e *Eixo*.

**Caixa Espiral:** é uma tubulação de forma toroidal que envolve a região do rotor, fabricada com chapas de aço, é uma peça impossível de ser removida pois é integrada à estrutura civil da Usina. Está conectada ao conduto forçado (Adutora) e à seção de saída (Pré-distribuidor).

**Pré-distribuidor:** a função desta seção é direcionar a água para o distribuidor reduzindo a turbulência da saída da água. Fabricado também com placas de aço carbono é soldado à caixa espiral.

**Distribuidor:** sistema que pode funcionar manual ou automaticamente. Regula a vazão da água e, conseqüentemente, controla a potência da turbina.

**Tubo de sucção:** normalmente com um diâmetro maior que o conduto forçado (adutora) para diminuir a turbulência da saída da água, esta seção devolve a água ao leito do rio (jusante).

**Rotor e Eixo:** ocorre a conversão da energia potencial do rio em potência de eixo para movimentar o sistema de geração de energia no gerador.

São quatro os tipos principais de turbinas existentes (QUITELA, 2007):

**Turbinas Pelton:** quedas de 350m até 1100m, trabalha com velocidades maiores que os outros modelos. Esta turbina possui 6 bocais e estes podem ser acionados independentemente e assim possui boa performance de funcionamento em diversas condições de operação.

**Turbinas Francis:** operam em quedas entre 40m e 400m. A maioria das turbinas em Usinas brasileiras utilizam este tipo de turbina e com quedas de 100m a 150m.

**Turbinas Kaplan:** são indicadas para quedas menores, 20m a 50m. Suas pás são móveis e assemelham-se a um propulsor de navio.

**Turbinas Bulbo:** estas turbinas operam em quedas menores que 20m. São similares às turbinas Kaplan, mas atuam de forma horizontal e antes da água entrar em contato com as pás ela passa por um Bulbo devido a baixa queda para acelerar o fluxo de água.

A Usina Hidrelétrica de Tucuruí é formada por uma barragem de 8005 m de largura e 78 m de altura, que é alimentado pelo rio Tocantins, área alagada do reservatório de 2850 Km<sup>2</sup>. Atualmente a usina opera em sua capacidade total com uma potência instalada de 8370 MW e está entre as 3 maiores geradoras do País sendo responsável por aproximadamente 10% de toda a capacidade instalada no Brasil.

Esta usina conta com 12 unidades geradoras de 350 MW cada, que fazem parte da primeira casa de força construída na primeira etapa da usina e duas auxiliares de 22,5 MW, foram concluídas em dezembro de 1992. Em junho de 1998, iniciou-se a construção da segunda casa de força, que foi concluída em abril de 2007 com 11 unidades geradoras de 375 MW cada. A usina utiliza turbinas do tipo Francis e o diâmetro do conduto forçado é de 11,4m.

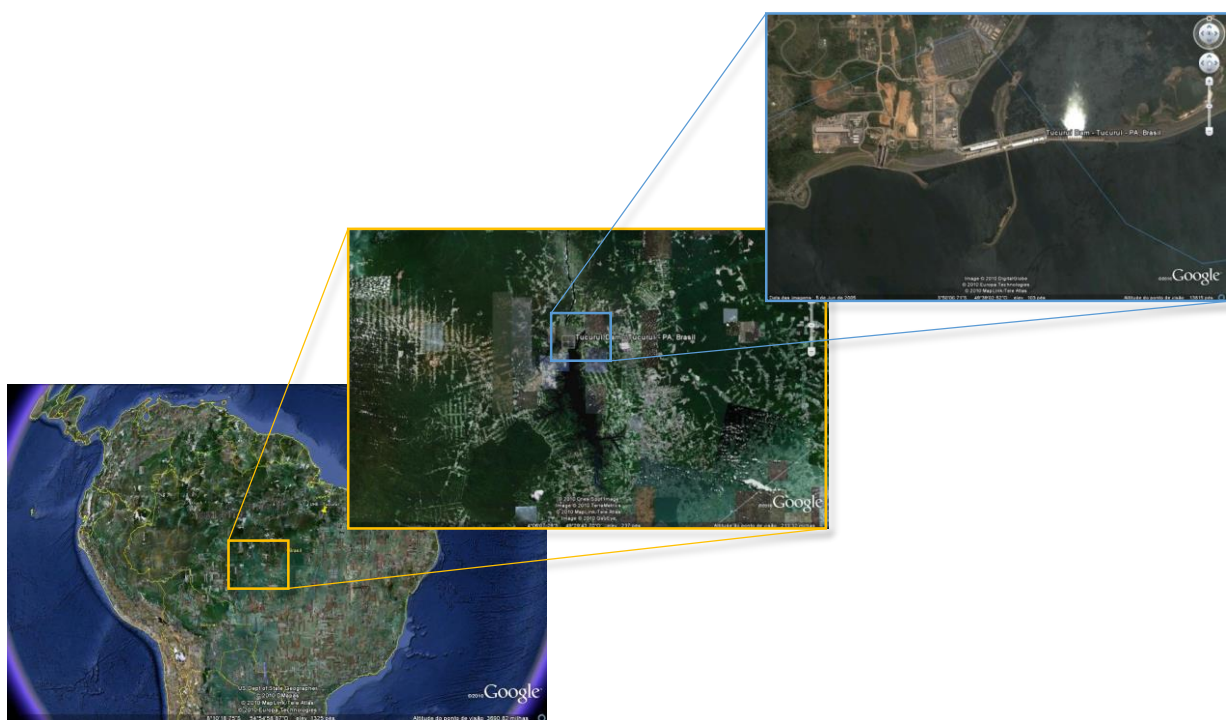
## CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILME EM CORPOS DE PROVA METÁLICOS, USINA HIDRELÉTRICA DE TUCURUÍ

Serão apresentadas as metodologias e resultados relacionados à Caracterização dos micro-organismos que atuam no processo de corrosão influenciada por micro-organismos (CIM) na Usina Hidrelétrica de Tucuruí, Município de Tucuruí (PA) – Brasil.

### 3.1 Metodologia

#### 3.1.1 Área experimental

Os experimentos foram realizados na Usina Hidrelétrica de Tucuruí (UHE-Tucuruí) no município de Tucuruí (PA), a 400 Km de Belém (PA). Coordenadas geográficas 03° 45' 03" S e 49° 40' 03" W (FIGURA 14).



**Figura 14 – Localização geográfica da Usina Hidrelétrica de Tucuruí, Município de Tucuruí (PA) - Brasil**

Fonte: Google Maps, US Dept of State Geographer 2010 Map Link/Tele Atlas



Foram instalados corpos de prova (CP's) em estações de avaliação de corrosão (BERTON, GARCIA, 2010) onde circula constantemente água do reservatório da UHE-Tucuruí (FIGURA 15).



**Figura 15 – Referência da 1ª e 2ª etapas de construção da UHE-Tucuruí e visualização das casas de força (1 e 2) e vertedouro da usina**

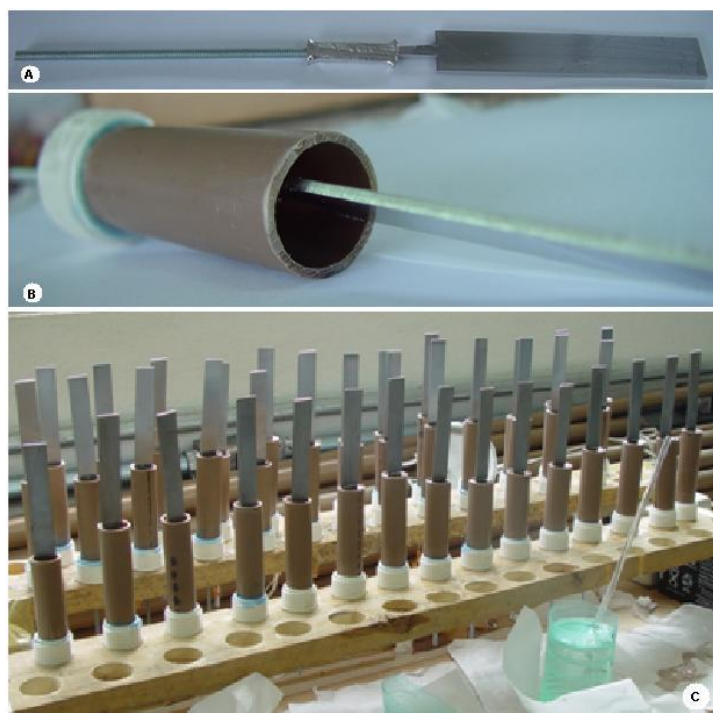
Fonte: Google Maps, US Dept of State Geographer 2010 Map Link/Tele Atlas

### 3.1.2 Preparo de amostra

Na UHE-Tucuruí foram utilizados corpos de prova metálicos que são compostos principalmente de aço carbono 1020 (Figura 16). Também foi avaliada a qualidade da água sob os aspectos físico-químicos e bacteriológicos, sendo que o último será utilizado para detecção do nível de contaminação do rio que alimenta o reservatório por material orgânico.

Devido à distância entre o município de Tucuruí (PA) e Curitiba (PR) as análises microbiológicas e físico-químicas da água foram realizadas no estado do Pará em laboratório especializado.

Para a confecção dos CP's (Figura 16), depois de lavadas e secas, as chapas de aço foram conectadas a uma barra com rosca através de uma junção metálica, como mostra a Figura 16 (A). Após isto o conjunto foi colocado em um tubo de PVC, onde foi colocada a resina epóxi, como mostra a Figura 16 (B). Então a resina epóxi foi preparada e colocada em todos os eletrodos em um arranjo experimental como mostra a Figura 16 (C).



**Figura 16 – Confecção de Corpos de prova metálicos. Conjunto de eletrodo e barra de rosca com contato metálico (A), Conjunto de eletrodo e barra de rosca dentro do tubo de PVC (B) e Fotografia do arranjo experimental da preparação de corpos-de-prova, etapa de preenchimento dos tubos com resina epóxi bi-componente (C)**

Fonte: Laboratório de Eletroquímica e Corrosão – Departamento de Materiais (LACTEC)

### **3.1.3 Arranjo experimental**

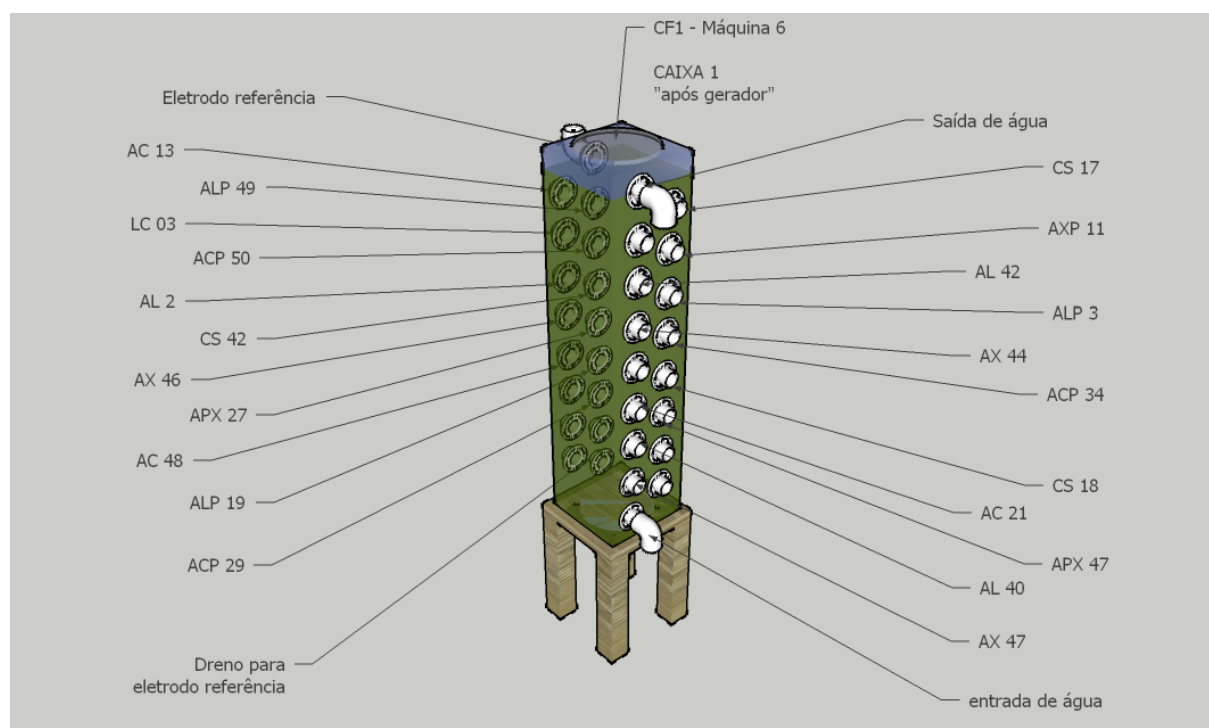
Foram realizadas 6 coletas (ciclos de 2 meses). As amostras de corpos de prova estavam instaladas em estações de corrosão (BERTON, GARCIA 2010) e seguiram o planejamento de instalações e coletas conforme Quadro 9. Estas estações são compostas basicamente por caixas acrílicas onde circula continuamente água do

reservatório da usina, que é alimentado pelo rio Tocantins, mesma água que se utiliza para movimentar as turbinas e que está em contato direto com as superfícies metálicas de tubulações e equipamentos.

**Quadro 9 – Cronograma de execução das coletas – UHE-Tucuruí.**

UHE-Tucuruí	1ª coleta amostra	2ª coleta amostra	3ª coleta amostra	4ª coleta amostra	5ª coleta amostra	6ª coleta amostra
Instalação o FEV/2011	Coleta MAR/2011 1	Coleta MAI/2011	Coleta JUL/2011 1	Coleta SET/2011 1	Coleta DEZ/2011 1	Coleta MAR/2012 2

Conforme Figura 17, observa-se o desenho esquemático das estações de corrosão (BERTON, GARCIA, 2010) e a localização de todos os corpos de prova instalados na UHE-Tucuruí.



**Figura 17 – Desenho esquemático da estação de corrosão e identificação da localização dos CP's no ponto de coleta CF1-Máquina 6 da UHE-Tucuruí.**

Fonte: O Autor

Os corpos de prova coletados foram transportados para Curitiba, onde foram analisados pelo Laboratório de materiais do LACTEC e o Laboratório de Microbiologia e biologia molecular (LabMicro) da UFPR.

Para o transporte dos corpos de prova, que foram coletados periodicamente, coletaram-se os CP's e foram acondicionados em frascos separadamente para que não sofressem contaminação cruzada. Os frascos de coleta sofreram tratamento prévio para desinfecção seguindo a seguinte sequência: lavagem com detergente, enxague com água corrente ( repetição 10x), 1h em contato com solução de hipoclorito de sódio 2,5% (w/v), enxague com água corrente (repetição 10x), 1h de contato com álcool 70%, enxague com água corrente (repetição 10x), enxague com água destilada (10x), exposição à lâmpada germicida UV com comprimento de onda de 254 nm durante 45 min, fechamento da abertura para rosqueamento do CP com papel filtro autoclavado e selamento com do conjunto com plástico filme de PVC. Ao serem coletados os CP's e inseridos no frasco coletor, estes eram acondicionados em container de isopor e mantidos refrigerados para transporte ao laboratório, temperatura de 4 °C a 8 °C e prazo de entrega de até 48h.

### 3.1.4 Meios de cultivo

Os meios de cultivo e soluções foram esterilizados: em autoclave, 121°C a 1 atm por 20 min, ou através de filtros Millipore 20 µm (meios de cultura, soluções e reagentes sensíveis ao calor). Vidrarias foram autoclavadas por 40 min, frascos, ponteiros e tubos tipo *Eppendorf* autoclavados à pressão de 1 atm, por 15 min. Todo material contaminado foi esterilizado antes do descarte.

Foi utilizado o meio de cultura comercial ***Tryptic Soy Case*** (Acumedia), para o isolamento de bactérias anaeróbicas facultativas e aeróbicas Totais. Para o isolamento de fungos foi utilizado o meio **Ágar Batata Dextrose (BDA)** (Acumedia) e meio **Sabouraud** (Acumedia).

Meio seletivo para bactérias oxidantes do Ferro, o meio de cultivo Leathen-Mcintyre-Braley foi preparado com: Sulfato de amônio 0,15 g/L, Nitrato de Cálcio 0,01 g/L, Fosfato de Potássio dibásico 0,05 g/L, Sulfato de Magnésio 0,5 g/L, Cloreto de Potássio 0,05 g/L, Água destilada qsp 1000 mL (APHA ET AL. 2005). Após a

esterilização foi adicionado 10 mL da solução de sulfato ferroso 10% esterilizada em filtro millipore. O pH foi ajustado a 3,5 com NaOH (2 M) e alíquotas de 10 mL do meio foram distribuídas em tubos de ensaio esterilizados com tampa rosqueável.

Meio seletivo para bactérias redutoras de sulfato, segundo formulação sugerida pelo *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (APHA *et al.*, 2005), foram utilizados: Glicose 0,15 g/L, Lactato de sódio 3,5 g/L, Extrato de carne 1,0 g/L, Peptona 2,0 g/L, Sulfato de Sódio 1,5 g/L, Fosfato de potássio dibásico 0,5 g/L, Sulfato de magnésio 2,0 g/L, Cloreto de Cálcio 0,1 g/L, Água destilada qsp 1000 mL. Preparou-se duas soluções separadamente para que fossem adicionadas após esterilização do meio seletivo para BRS. Solução 1 (Ascorbato de sódio 1 g/ 100 mL) e solução 2 (Sulfato ferroso amoniacal 3,92 g/ 100 mL). O pH deve estar em  $7,5 \pm 0,3$  após a esterilização. Portanto preparou-se o meio sem as soluções “1” e “2”, que foram dispensados em tubos com tampa rosqueável e esterilizados. Para o inóculo, os tubos foram completamente cheios, então reservou-se meio extra esterilizado para preencher o volume total dos tubos de ensaio. No momento em que são inoculadas as amostras neste material, foram preparadas as soluções “1” e “2”, que foram esterilizadas por filtração (membrana 0,45 micrometros) e adicionou-se 1 mL de cada solução para 100 mL do meio principal.

### **3.1.5 Soluções e Reagentes**

#### **3.1.5.1 Solução Salina 0,85%**

Solução 0,85% (p/v) de NaCl (8,5 g/L de NaCl dissolvidos em Água destilada).

#### **3.1.5.2 Taq DNA Polimerase (Invitrogen)**

Utilizou-se Taq DNA polimerase para reações de amplificação, marca Invitrogen, na concentração de 5 U/  $\mu$ L.

#### **3.1.5.3 dNTP (Invitrogen)**

Os quatro desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) estoques (100 mM), foram diluídos em água ultrapura (Tipo I) a 2,5 mM (solução única). Nas reações de amplificação, a concentração final utilizada foi de 0,2 mM.

#### **3.1.5.4 EDTA 0,5 M**

No preparo desta solução foram utilizados: EDTA 372,2 g/L e Água destilada qsp 1000 mL.

O EDTA foi pesado e acrescentado uma parte de água ultrapura (Tipo I) autoclavada (aproximadamente 80% - 800mL). O pH foi corrigido inicialmente com NaOH em *pellet* (aproximadamente 20 g) e o ajuste final (pH 8,0) foi feito com NaOH (4N). Para obtenção de EDTA 50mM, dilui-se esta solução dez vezes. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

#### **3.1.5.5 Gel de Agarose (0,8% p/v) (Invitrogen)**

Utilizou-se para o preparo do Gel: Agarose 8 g/L em Tampão TBE 1X.

#### **3.1.5.6 Gel de Agarose (1,6% p/v) (Invitrogen)**

Utilizou-se para o preparo do Gel: Agarose 16 g/L em Tampão TBE 1X.

#### **3.1.5.7 Oligonucleotídeos iniciadores (Primers)**

Os oligonucleotídeos iniciadores foram diluídos em tampão TE (solução 4 mM), usando o peso molecular individual fornecido pelo fabricante. Quando diluídos foram mantidos a -20°C.

#### **3.1.5.8 Tampão da Amostra para eletroforese**

O Tampão foi preparado com: Sacarose 400 g/L, Azul de bromofenol 2,5 g/L e Água destilada.

Os reagentes foram solubilizados e mantidos a 4°C.

#### **3.1.5.9 Tampão CTAB**

Utilizou-se: Tris-base 30,25 g/L, Na-EDTA 9,25 g/L, CTAB 25 g/L, Cloreto de sódio 102,5 g/L e Água ultrapura (Tipo I) qsp 100 mL. O pH final foi ajustado para 7,5.

A solução foi aquecida para que o Na-EDTA e o CTAB fossem dissolvidos e

o volume foi completado para 100 mL com água Ultrapura (Tipo I) autoclavada.

#### **3.1.5.10 Tampão de Corrida para Gel de Agarose (TBE 10X – pH 8,0)**

Para o preparo do Tampão foram utilizados: Tris-base 108 g/L, Ácido Bórico 55 g/L, EDTA (0,5M) 40 mL/L e Água ultrapura (Tipo I) qsp 1000 mL.

#### **3.1.5.11 Tampão Tris-EDTA (TE)**

Tris-HCL (pH: 8,0)	20mM
--------------------	------

EDTA	20mM
------	------

#### **3.1.5.12 Solução de Brometo de Etídio**

Foram dissolvidos 1,0% (p/v) de brometo de etídio em água ultrapura (Tipo I), que foi agitada por várias horas (SAMBROOK *et al.*, 2002). A solução foi estocada à temperatura de 8°C longe de fontes luminosas. Para revelação, foram diluídos 3 µL/L de brometo em de água ultrapura (Tipo I).

### **3.1.6 Análise dos corpos de prova (inóculo)**

Preparou-se o inóculo através da adição de aproximadamente 15 cm<sup>2</sup> de tubérculo de corrosão de cada corpo de prova (CP's) em 100 mL de solução salina (NaCl 0,85% p/v) esterilizada. Para a obtenção deste material raspou-se uma das faces dos CP's com lâminas esterilizadas (cada um dos corpos de prova são tratados separadamente). Foram realizadas as diluições necessárias e com estas foi possível realizar os inóculos para: isolamento de bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas, isolamento de fungos, presença/ausência de Bactérias oxidantes do ferro e presença/ausência de Bactérias redutoras de sulfato.

### **3.1.7 Isolamento de bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas Totais**

Realizou-se a homogeneização das amostras (inóculos já diluídos) em um agitador de tubos e inoculou-se 100 µL das amostras em placas de Petri com meio caldo de soja (*Tryptic soy case* – Acumedia). O inóculo foi homogeneizado sobre o meio de cultivo com o auxílio de uma alça de Drigalski (técnica da semeadura). As

placas foram incubadas à temperatura de 30°C em BOD, por 2-3 dias. Posteriormente à incubação, as colônias bacterianas foram contadas e calculou-se o número de unidades formadoras de colônia por unidade de área raspada do corpo de prova (UFC/m<sup>2</sup>).

### **3.1.8 Presença / Ausência de bactéria oxidante de ferro**

Foram inoculados 5 mL do inóculo em tubos de ensaio com Meio seletivo *Leathen-Mcintyre-Braley* e incubado a 30°C por 15-20 dias.

Lâminas de Gram foram confeccionadas conforme Konemam et. Al (KONEMAN *et al.*, 2008) e comparadas com fotos existentes no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA *et al.*, 2005). Adicionou-se 2 gotas da solução de Ferrocianeto de Potássio 1% em cada tubo teste após o período de incubação. A coloração azul intenso (Azul da Prússia) indica a presença de Fe<sup>2+</sup> insolúvel e, somada ao resultado da coloração de Gram, confirma-se a presença de Bactéria oxidantes de ferro.

### **3.1.9 Presença / Ausência de bactérias redutoras de sulfato**

As amostras foram inoculadas em um meio específico para bactérias sulfato-redutoras (APHA *et al.*, 2005). É necessário utilizar uma metodologia específica para o preparo de tubos com o meio de cultura (FIGURA 18), que foram esterilizados e possuem atmosfera interna reduzida de oxigênio. Este meio foi transferido aos tubos de ensaio que possuem tampa rosqueável de baquelite e rolha de borracha, que asseguram a vedação do sistema, garantindo o isolamento e, assim, manutenção do meio isento de oxigênio, característica necessária para o isolamento das Bactérias Sulfato Redutoras (BRS), que são anaeróbicas estritas.

Para a confecção destes tubos foi realizado o seguinte procedimento: Autoclavou-se o tubo de ensaio com o meio de cultura e separadamente as rolhas de borracha e agulhas metálicas. A esterilização foi realizada durante 15 min, 121°C a 1 atm em autoclave vertical. Foi adicionado ao tubo com meio de cultivo autoclavado o inóculo e preenchido até a capacidade máxima do tubo com o mesmo meio de cultura, que foi autoclavado previamente e separado para este propósito. Para completa



vedação deste sistema, utilizou-se a rolha de borracha que foi inserida no tubo (deve-se tomar o cuidado para que não fique nenhuma bolha de ar no interior do tubo). A agulha de metal autoclavada auxilia este processo de inserção da rolha (FIGURA 18), adaptado de (RODRIGUEZ-CAVALLINI, CRUZ, 1999).

A presença de Bactérias redutora de sulfato é assinalada pela formação de depósito de **sulfeto ferroso**, de coloração preta, após 20-30 dias de incubação em estufa de anaerobiose com recirculação de gás carbono a temperatura de 30°C.



**Figura 18 – Detalhamento dos materiais para confecção de tubos com ausência de O<sub>2</sub>**

Fonte: Autor

### **3.1.10 Isolamento de Fungos**

Utilizando-se o mesmo inóculo, obtido dos corpos de prova, inoculou-se 100 µL em placa de Petri com meio de cultura (BDA – Acumedia). O inóculo foi espalhado com alça de Drigalski (Técnica da sementeira). As placas foram incubadas a temperatura de 25°C em BOD, por 4-7 dias. Posteriormente à incubação, as colônias fúngicas foram contadas e calculou-se o número de unidades formadoras de colônia por unidade de área raspada do corpo de prova (UFC/m<sup>2</sup>)

### 3.1.11 Identificação de micro-organismos

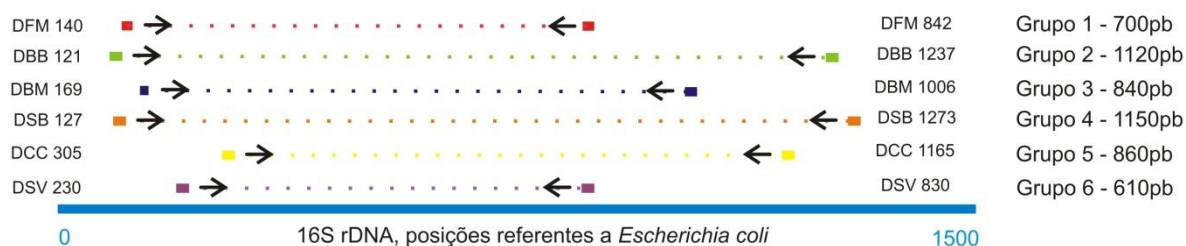
#### 3.1.11.1 Bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas

Para a classificação das bactérias Gram-positivas e negativas foi realizada a técnica de coloração de Gram (KONEMAN *et al.*, 2008). As bactérias Gram-positivas do gênero *Bacillus* foram caracterizadas por provas bioquímicas e morfologia (BUCHANAN, GIBBONS, 1974). Os grupos taxonômicos *Pseudomonas* sp e Enterobactérias (Gram-negativas) foram determinados através de provas bioquímicas, características morfológicas e marcadores moleculares (KONEMAN *et al.*, 2008).

#### 3.1.11.2 Identificação de BRS por amplificação com oligonucleotídeos específicos

A identificação de bactérias anaeróbicas, como *Desulfovibrio*, é laboriosa e demanda muito tempo para sua conclusão por meio dos métodos convencionais. Os micro-organismos acidófilos, que aceleram a oxidação do ferro, apresentam uma grande diversidade, porém seu isolamento e identificação também são dificultados por limitações técnicas. Na tentativa de minimizar estas dificuldades, a metagenômica surgiu como uma estratégia para acessar a diversidade microbiana de amostras ambientais de maneira rápida e eficiente.

O DNA total do biofilme formado nos corpos de prova foi extraído por meio do *kit Power Soil DNA (MoBio Labs)*. Foram utilizados os CP's (Figura 16) expostos nas caixas acrílicas que foram instaladas (FIGURA 17) na usina hidrelétrica. O DNA purificado a partir da amostra é representativo de todos os micro-organismos presentes nesta amostra. Por meio de sua amplificação com oligonucleotídeos iniciadores específicos (QUADRO 10) para genes que codificam RNAs ribossômicos, como o 16S rRNA (FIGURA 19), é possível a detecção de grupos de BRS (DEVEREUX *et al.*, 1992).



**Figura 19 – Posições dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) no gene 16S em relação a numeração da *E. coli* (DALY *et al.*, 2000)**

Fonte: Autor

**Quadro 10 – Sequências de oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificação de regiões do DNAr 16S recomendadas para identificação de grupos BRS (DALY *et al.*, 2000)**

Primer	Sequência de nucleotídeos 5' – 3'*	Especificidade	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho de fragmento (bp)	Gêneros
DFM140	TAG MCY GGG ATA ACR SYK G	Grupo 1	58	700	<i>Desulfotomaculum</i> sp
DFM842	ATA CCC SCW WCW CCT AGC AC				
DBB121	CGC GTA GAT AAC CTG TCY TCA TG	Grupo 2	66	1120	<i>Desulfobulbus</i> sp
DBB1237	GTA GKA CGT GTG TAG CCC TGG TC				
DBM169	CTA ATR CCG GAT RAA GTC AG	Grupo 3	64	840	<i>Desulfobacterium</i> sp
DBM1006	ATT CTC ARG ATG TCA AGT CTG				
DBM127	GAT AAT CTG CCT TCA AGC CTG G	Grupo 4	60	1150	<i>Desulfobacter</i> sp
DSB1273	CYY YYY GCR RAG TCG STG CCC T				
DCC305	GAT CAG CCA CAC TGG RAC TGA CA	Grupo 5	65	860	<i>Desulfovibrio</i> sp <i>Desulfosarcina</i> sp <i>Desulfococcus</i> sp <i>Desulfonema</i> sp
DCC1165	GGG GCA GTA TCT TYA GAG TYC				
DSV230	GRG YCY GCG TYY CAT TAG C	Grupo 6	61	610	<i>Desulfovibrio</i> sp
DSV838	SYC CGR CAY CTA GYR TYC ATC				

\*Ambiguidades: R(G ou A); Y (C ou T); K (G ou T), M (A ou C); W (A ou T).

Fonte: (DALY *et al.*, 2000)

### 3.1.11.3 Fungos

A identificação dos fungos foi realizada por meio da observação de estruturas de reprodução, utilizando a técnica do microcultivo, com lâminas de 7 a 14 dias de cada morfogrupo (KERN, BLEVINS, 1999). As lâminas foram fixadas, coradas em

lactofenol com 0,05% de azul de algodão e lactofenol de Amann, após processo de confecção foram analisadas ao microscópio óptico (aumento 400X).

A classificação dos fungos foi realizada através de observações das preparações microscópicas com utilização de literatura especializada (HOOG, 2000; KLICH, PITT, 1988; BARNETT, HUNTER, 1987; LARONE, 1987; HAZEN *et al.*, 1973; KERN, BLEVINS, 1999; HERRERA, ULLOA, 1990; MENEZES, OLIVEIRA, 1993).

Foi realizada extração do DNA dos isolados, através de protocolo de extração de massa micelial recém cultivada, utilizou-se cultivo em BDA dos isolados fúngicos dos CP's e foram incubados por 7 dias a 28°C. O micélio foi coletado e macerado (VICENTE, 2000).

As sequências contíguas ITS-1 (Região espaçadora intergênica), 5,8S e ITS-2 foram sequenciadas utilizando um conjunto de *primers* ITS-1 (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) e ITS-4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) (WHITE ET AL. 1990). Foi realizada PCR em 10 µL de reação, que contém: 0,5 µL de tampão para PCR (10x *Applied Biosystems*), 0,5 µL do primer (50 pmol), 0,5 µL do *Big Dye* (*Applied Biosystems*), 1 µL do produto de PCR e água ultrapura (Tipo I) qsp 10 µL. Realizados 35 ciclos, onde 96°C por 10s (desnaturação), 50°C por 5s (anelamento), 60°C por 4min (extensão) durante os 35 ciclos e 60s para o alongamento no final dos 35 ciclos. O Sequenciamento foi realizado no equipamento *ABI 3130 automatic sequencer* (*Perkin-Elmer*, Massachusetts, USA).

As sequências foram editadas utilizando-se o programa STADEN PACKAGE (BONFIELD *et al.*, 2002). As regiões ITS serão alinhadas utilizando a máxima similaridade por meio do editor de sequência MEGA 5 (TAMURA *et al.*, 2011). As análises das sequências devem ser realizadas utilizando o software BLASTn disponível no banco de dados da NCBI.

### 3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas 6 coletas, a identificação das amostras coletadas encontra-se no Quadro 11.

**Quadro 11 – Relação dos CP's coletados, identificação da localização das amostras, data de coleta e período de exposição.**

Código	Metal	Localização	Característica	Data / Coleta	Exposição
AC06	Aço carbono 1020	Máquina 6	Antes do sistema de injeção de Cloro	MAR / Coleta 1	1 semana
AC13	Aço carbono 1020	Máquina 6	Após gerador	MAR / Coleta 1	1 semana
AC15	Aço carbono 1020	Máquina 6	Antes do sistema de injeção de Cloro	MAI / Coleta 2	13 semanas
AC48	Aço Carbono 1020	Máquina 6	Após Gerador	MAI / Coleta 2	13 semanas
AC45	Aço Carbono 1020	Máquina 15	Antes do trocador de calor do transformador	MAI / Coleta 2	13 semanas
AC11	Aço carbono 1020	Máquina 6	Antes do sistema de injeção de Cloro	JUL / Coleta 3	22 semanas
AC21	Aço Carbono 1020	Máquina 6	Após Gerador	JUL / Coleta 3	22 semanas
AC16	Aço Carbono 1020	Máquina 15	Antes do trocador de calor do transformador	JUL / Coleta 3	22 semanas
AC19	Aço carbono 1020	Máquina 6	Antes do sistema de injeção de Cloro	SET / Coleta 4	31 semanas
AC07	Aço Carbono 1020	Máquina 6	Após Gerador	SET / Coleta 4	31 semanas
AC24	Aço Carbono 1020	Máquina 15	Antes do trocador de calor do transformador	SET / Coleta 4	31 semanas
AC38	Aço carbono 1020	Máquina 6	Após Regulador de Velocidade	DEZ / Coleta 5	42 semanas
AC40	Aço Carbono 1020	Máquina 9	Após Regulador de Velocidade	DEZ / Coleta 5	42 semanas
AC62	Aço carbono 1020	Máquina 6	Após Regulador de Velocidade	MAR / Coleta 6	13 semanas
AC58	Aço Carbono 1020	Máquina 9	Após Regulador de Velocidade	MAR / Coleta 6	13 semanas
AC71	Aço Carbono 1020	Máquina 15	Após Gerador	MAR / Coleta 6	13 semanas
AC51	Aço carbono 1020	Máquina 13	Após Gerador	MAR / Coleta 6	13 semanas

A Tabela 1 apresenta os CP's coletados, sua localização (estação de corrosão de instalação dos CP's), Data de Coleta, Média de UFC/m<sup>2</sup> de bactérias aeróbias/anaeróbias facultativas e Média de UFC/m<sup>2</sup> de Fungos (Calculados através de análise de variância – ANOVA e teste Tukey), presença/ausência (PRE/AUS) bactérias redutoras de sulfato (BRS) e presença/ausência (PRE/AUS) de bactérias oxidantes do ferro.

**Tabela 1 Caracterização dos CP's de aço carbono (AC) expostos nas estações de corrosão na UHE-Tucuruí período de 2011-2012**

Localização nas Estações de Corrosão	CP	Data Coleta	Bactérias log UFC/m <sup>2</sup>	Fungos log UFC/m <sup>2</sup>	PRES/AUS BRS	PRES/AUS Ferrobactéria
antes do cloro Maq-6	AC 6	MAR/Coleta 1	6,77010	7,09047	Negativo	Negativo
depois do cloro Maq-6	AC 13	MAR/Coleta 1	7,16060	7,30517	Negativo	Negativo
antes do cloro Maq-6	AC 15	MAI/Coleta 2	7,50888	6,30252	Positivo	Negativo
depois do cloro Maq-6	AC 48	MAI/Coleta 2	7,34442	6,44585	Positivo	Negativo
antes do cloro Maq-15	AC 45	MAI/Coleta 2	7,44258	6,27700	Positivo	Positivo
antes do cloro Maq-6	AC 11	JUL/Coleta 3	7,94090	5,56380	Positivo	Positivo
depois do cloro Maq-6	AC 21	JUL/Coleta 3	7,84480	3,51465	Positivo	Positivo
antes do cloro Maq-15	AC16	JUL/Coleta 3	8,11423	5,99815	Positivo	Positivo
antes do cloro Maq-6	AC19	SET/Coleta 4	3,93480	3,08535	Positivo	Positivo
depois do cloro Maq-6	AC7	SET/Coleta 4	4,43725	3,17580	Negativo	Positivo
antes do cloro Maq-15	AC24	SET/Coleta 4	3,95505	6,31920	Positivo	Positivo
sem MXD Maq-6	AC38	DEZ/Coleta 5	7,22383	6,69950	Positivo	Negativo
com MXD Maq-9	AC40	DEZ/Coleta 5	7,41580	7,50224	Positivo	Negativo
sem MXD Maq-6	AC 62	MAR/Coleta 6	7,85093	6,76858	Positivo	Positivo
com MXD Maq-9	AC 58	MAR/Coleta 6	7,40013	6,94792	Positivo	Negativo
sem MXD Maq-15	AC 71	MAR/Coleta 6	8,32010	6,88216	Positivo	Negativo
com MXD Maq-13	AC 51	MAR/Coleta 6	8,89400	6,55300	Positivo	Negativo

### 3.2.1 Isolamento de bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas Totais

Quantificou-se as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por m<sup>2</sup> de superfície metálica para bactérias aeróbias/anaeróbias facultativas, ver Tabela 1. O delineamento foi inteiramente casualizado e os dados foram analisados por ANOVA seguida de teste Tukey para comparação de médias ( $p < 0,01$ ) utilizando software ASSISTAT v7.6 (Apendice A). Foi também avaliada a eficiência de hipoclorito de cálcio e MXD-100 (empresa MAXCLEAN) como agentes de controle microbiológico.

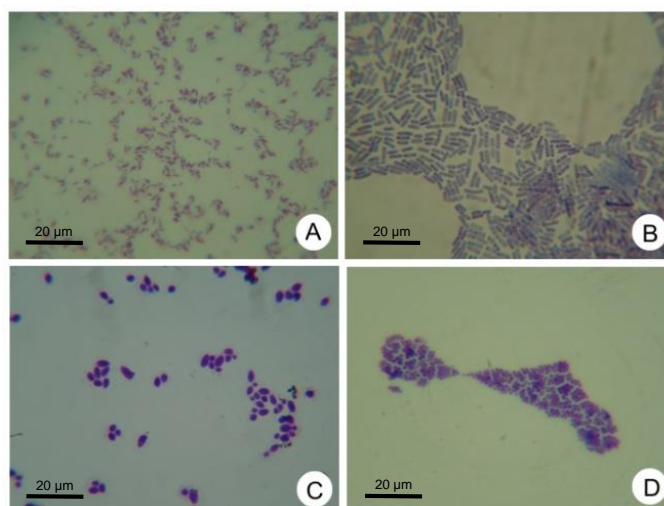
A Tabela 1 e o gráfico da contagem microbiológica (FIGURA 20) apresentam os resultados obtidos para a contagem de micro-organismos em UFC/m<sup>2</sup>, referente à raspagem da superfície (para verificar a área ver Tabela 1) de cada corpo-de-prova (CP).



**Figura 20 – Contagem microbiológica de Bactérias totais. Valores expressos em log UFC/m<sup>2</sup> de superfície metálica exposta às águas do reservatório da UHE-Tucuruí e dados de chuva bruta (mm) e vazão do rio Tocantins (m<sup>3</sup>/s).**

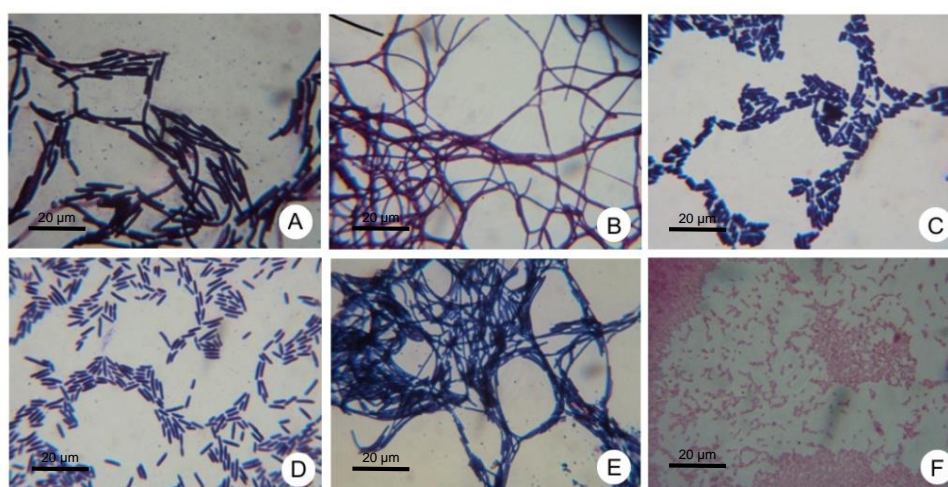
Fonte: Dados hidrológicos (ANA, Estação Tucuruí (29700000); 2012, ANA, Estação Tucuruí (349000); 2012)

Foram isoladas 358 bactérias das famílias Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Micrococcaceae e Bacillaceae. Verificou-se a presença de bacilos Gram-positivos, bacilos Gram-negativos, cocobacilos Gram-negativos, cocos Gram-positivos, bactérias filamentosas Gram-positivas e Gram-negativas. Como pode ser visto na Figura 21 e Figura 22, respectivas às coletas 1 e 2, é possível visualizar a grande variabilidade e diversidade morfológica dos micro-organismos isolados.



**Figura 21 – Isolados microbianos (Coleta 1). Bacilos gram-positivos com formação de esporos subterminais (A), Bacilos gram-positivos com formação de esporos centrais (B), Leveduras (C), Bactérias em morfologia de estafilococos (D). Aumentos 1000X**

Fonte: O Autor.



**Figura 22 – Isolados microbianos (coleta 2). Bactérias filamentosas gram-positivas (A, B e E), Bacilos gram-positivos (C e D), Bacilo gram-negativo (F). Aumentos de 1000x.**

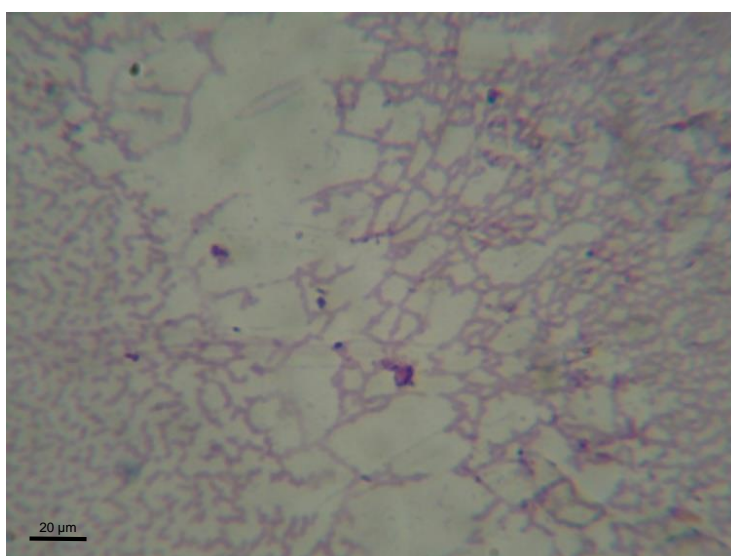
Fonte: O Autor.



### 3.2.2 Presença / Ausência de bactéria oxidante de ferro

Após o período de incubação das bactérias oxidantes de ferro, lâminas foram preparadas a partir do material contido nos tubos de cultivo onde observou-se turbidez indicando crescimento bacteriano.

Utilizou-se a técnica de coloração de Gram, e posteriormente observou-se ao microscópio, confirmando a presença de bactérias filamentosas Gram negativas (Figura 23), cuja morfologia é compatível com aquela observada em bactérias oxidantes de ferro.



**Figura 23 Bactéria gram-negativa com característica filamentosa. Aumento 1000x.**

Fonte: O Autor.

Após a adição da solução de ferrocianeto de potássio 1%, foi avaliado o aparecimento da coloração azul intenso, o que comprova a presença desse grupo. Os dados obtidos são apresentados na Tabela 1.

### 3.2.3 Presença / Ausência de bactérias redutoras de sulfato

Após o período de crescimento das bactérias em meio anaeróbico, a coloração escurecida dos tubos comprova o crescimento das bactérias redutoras de sulfato nas amostras. Os produtos das reações de PCR (reação em cadeia da polimerase) foram

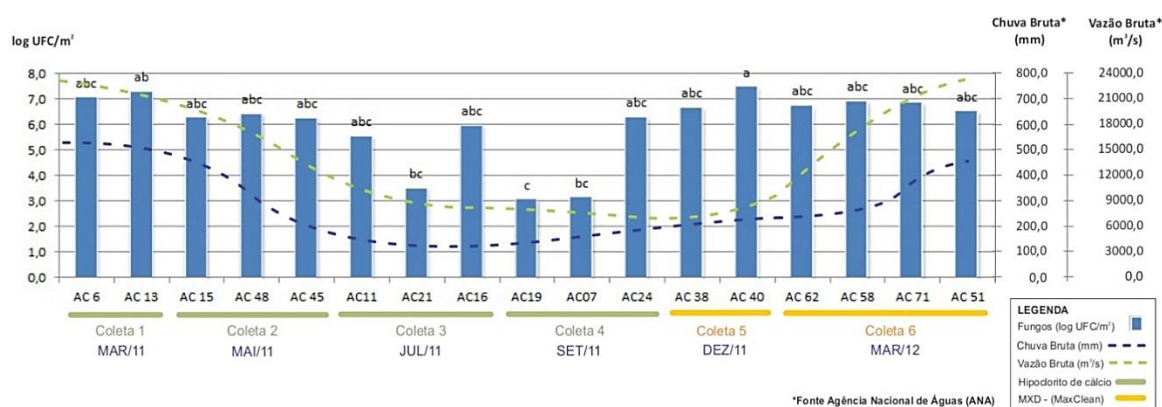
visualizados em gel de agarose, com auxílio do uso do marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen).

Foi possível observar a amplificação, resultados positivos (Tabela 1), para as bactérias correspondentes aos grupos 2, 5 e 6 (QUADRO 10), nos quais estão presentes os gêneros *Desulfobulbus* sp, *Desulfovibrio* sp, *Desulfosarcina* sp, *Desulfococcus* sp, *Desulfonema* sp e *Desulfovibrio* sp.

### 3.2.4 Isolamento de Fungos

Quantificou-se as UFC/m<sup>2</sup> de superfície metálica para fungos (Tabela 1). O experimento foi inteiramente casualizado e os dados foram analisados por ANOVA seguida de teste Tukey para comparação de médias ( $p < 0,01$ ) utilizando software ASSISTAT v7.6 (Apendice B). Foi também avaliada a eficiência de hipoclorito de cálcio e MXD-100 (empresa MAXCLEAN) como agentes de controle microbiológico.

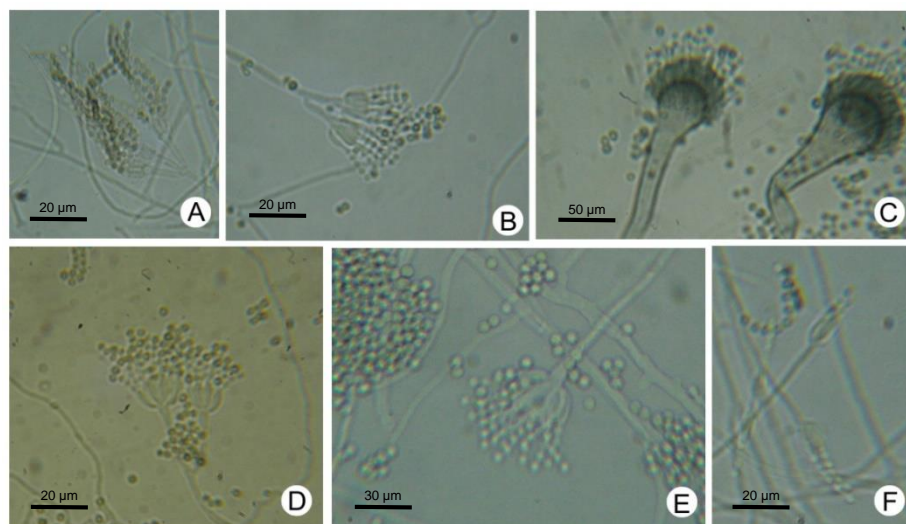
A Tabela 1 e o gráfico da contagem microbiológica (Figura 24) apresentam os resultados obtidos para a contagem de micro-organismos em unidades formadoras de colônia por metro quadrado (UFC/m<sup>2</sup>), referente à raspagem da superfície de cada corpo-de-prova (CP).



**Figura 24 - Contagem microbiológica de fungos. Valores expressos em log UFC/m<sup>2</sup> de superfície metálica exposta às águas do reservatório da UHE-Tucuruí e dados de chuva bruta (mm) e vazão do rio Tocantins (m<sup>3</sup>/s).**

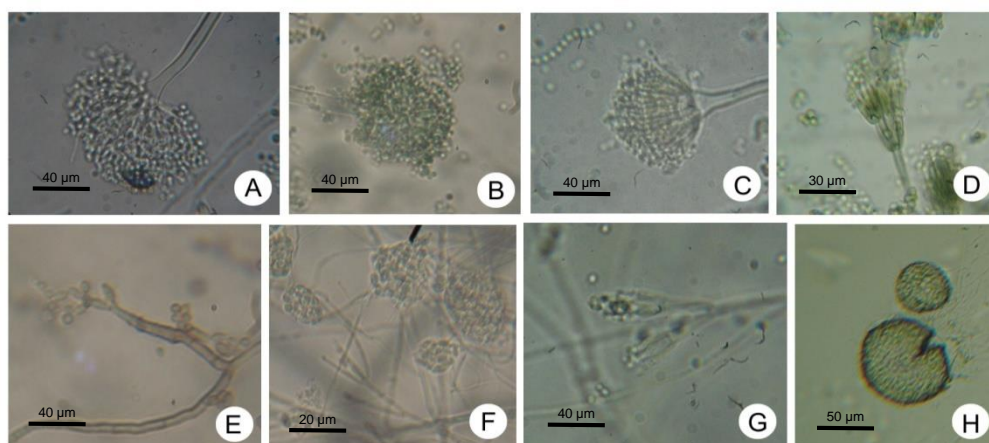
Fonte: Dados hidrológicos (ANA, Estação Tucuui (29700000); 2012, ANA, Estação Tucuui (349000); 2012)

Os 94 fungos isolados pertencem aos gêneros *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp, *Acremonium* sp, *Paecilomyces* sp, *Phoma* sp, *Blastomyces* sp, *Alternaria* sp, *Cladosporium* sp, *Chrysosporium* sp, *Nigrospora* sp, *Trychophyton* sp e *Rhizoctonia* sp (Figura 25 e Figura 26).



**Figura 25 – Micromorfologia dos fungos isolados dos CP's coleta 1 – UHE-Tucuruí. *Penicillium* sp (A, B, D e E) 400x, *Aspergillus* sp (C) 400x, *Paecilomyces* sp (F) 400x.**

Fonte: Autor



**Figura 26 - Micromorfologia dos fungos isolados dos CP's coleta 2 – UHE-Tucuruí. *Aspergillus* sp (A, B e C) 400x, *Penicillium* sp (D) 400x, *Cladosporium* sp (E) 1000x, *Acremonium* sp (F) 400x, *Paecilomyces* sp (G) 400x, *Phoma* sp (H) 400x.**

Fonte: Autor

## **CAPÍTULO 4 - AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE MICRO-ORGANISMOS POTENCIALMENTE FORMADORES DE BIOFILME A DIFERENTES BIOCIDAS**

Serão apresentadas as metodologias e resultados relacionados à sensibilidade dos micro-organismos formadores de biofilme em relação aos potenciais biocidas de origem química e de fontes naturais.

Os agentes de controle microbiológico empregados para desinfecção de superfícies foram: Glutaraldeído (1 ppm), Água Sanitária (1 e 3 ppm), Hipoclorito de Cálcio (1 e 3 ppm), NaOH (pH 9 e 12), Dicloro (1 e 3 ppm), Anólito ECA (RW) (1, 3, 5 e 10 ppm), MXD-100® (1 e 3 ppm), Azadiractin (1 e 3 ppm), Extrato de Neem (1 e 3 ppm), Óleo de Neem (1 e 3 ppm), Orobor (1 e 3 ppm), Óleo de Copaíba (1 e 3 ppm), Óleo de Cravo (1 e 3 ppm).

### **4.1 Atividade Antimicrobiana em Meio sólido**

Para avaliar a sensibilidade aos agentes de controle microbiológicos foi utilizado o método de disco-difusão em ágar (NCCLS, CLSI, 2003; NCCLS, CLSI, 2005). Os micro-organismos utilizados foram: *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212, *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Escherichia coli* ATCC® 35218, *Haemophilus influenzae* ATCC® 49247, *Haemophilus influenzae* ATCC® 49766, *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603, *Neisseria gonorrhoeae* ATCC® 49226, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 e *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 49619.

As linhagens foram inoculadas em caldo de soja tríptica (TSB). e incubadas a 35° C em estufa durante 18h, após o cultivo foi avaliada turbidez utilizando-se espectrofotômetro UV/VIS na faixa de comprimento de onda de 600nm, equivalente à padrão de McFarland a 0,5-(aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL de *E. coli* ATCC® 25922).

Em placa de ágar de soja tríptica foram realizados “orifícios” utilizando-se furador metálico esterilizado (8mm de diâmetro e 4mm de profundidade) visando à deposição

das soluções testes de biocidas para bactérias de interesse. Esta etapa foi realizada antes do inóculo do micro-organismo com *swab*, para garantir que não ocorressem contaminações e crescimento diferenciado devido ao tempo de preparo destas placas com os orifícios. As placas foram incubadas (não invertidas) em uma estufa, a 35°C, até 15 min após a aplicação do Biocida e inóculo com *swab* (GELINSKI *et al.*, 2007; SIQUEIRA JR *et al.*, 2000)

Os diâmetros dos halos de inibição total foram mensurados em milímetros utilizando um paquímetro, incluindo o diâmetro do orifício

#### **4.2 Atividade Antimicrobiana em meio líquido**

Para o teste em tubos com meio de cultivo líquido foi utilizado apenas um micro-organismo de cada família acima citada: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Pseudomonadaceae), *Escherichia coli* ATCC 25922 (Enterobacteriaceae), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Micrococcaceae). Os meios utilizados foram: Sais Mínimos M9 (M9), Água Peptonada (AP) e Caldo de Soja Triptonado (TSB).

As linhagens foram inoculadas em caldo de soja tríptica (TSB). e incubadas a 35° C em estufa durante 18h, após o cultivo foi avaliada turbidez utilizando-se espectrofotômetro UV/VIS na faixa de comprimento de onda de 600nm, equivalente à padrão de McFarland a 0,5-(aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL de *E. coli* ATCC® 25922). Foi inoculado em cada um dos tubos testados  $10^6$  UFC/mL (concentração obtida através da diluição do inóculo padronizado). Foi trabalho com concentração menor que  $10^8$  UFC/mL pois ao final do cultivo em meio líquido atingia-se esta concentração nos controle positivos e dessa maneira foi possível comparar os resultados obtidos entre as amostras com agentes de controle microbiológico e os controle positivos. Foi avaliada a atividade antimicrobiana, seguindo metodologia de teste em tubos com meio de cultivo líquido e análise da turbidimetria utilizando espectrofotômetro UV/VIS, leitura na faixa de 600nm. Foi medida a transmitância e comparada com curva padrão estabelecida através das medidas em espectrofotômetro de padrões da escala de MacFarland.

### 4.3 Delineamento experimental

O experimento foi inteiramente casualizado e os dados foram analisados por Análise Fatorial seguida de teste Tukey para comparação de médias ( $p < 0,01$ ) utilizando software ASSISTAT v7.6 (SILVA, AZEVEDO, 2009).

### 4.4 Resultados

Por meio do teste de disco difusão e turbidimetria, onde foram testados os diferentes agentes de controle microbiológico contra bactérias precursoras da formação de biofilmes foi possível se identificar potenciais substitutos aos compostos clorados cujos resultados estão demonstrados nas Figura 27 e Figura 28. É possível identificar agentes de controle biológico com poder antimicrobiano semelhantes a compostos comerciais tais como Hipoclorito de Sódio e Cálcio, que são utilizados atualmente na desinfecção de águas naturais de sistemas de resfriamento (MÄDER NETTO, 2011; GIORDANI *et al.*, 2005), consequentemente, utilizados para o controle da corrosão influenciada por micro-organismos.

O produto MXD-100 foi eficiente no controle do crescimento dos micro-organismos através da difusão pelo meio sólido e em meio líquido nas duas concentrações testadas, 1ppm e 3ppm (Figura 27 e Figura 28). Também é possível verificar que existem outras opções como a utilização de NaOH (Figura 27 e Figura 28) para alteração do pH do sistema de resfriamento para pH 9 e pH 12. Estes compostos foram eficientes tanto quanto água sanitária comercial a 3ppm (Figura 27 e Figura 28), que é utilizado como sanitizante de superfícies.

Normalmente são aplicados em Usinas Hidrelétricas produtos como Hipoclorito de Cálcio, Hipoclorito de Sódio, Dicloro, Cloro gasoso, Dicloroisocianurato de Sódio, além de outros compostos químicos tais como Hidróxido de Sódio, Ozônio, sulfato de Cobre e pinturas anti-incrustantes (GIORDANI *et al.*, 2005). Os compostos a base de cloro seguem legislação ambiental que prevê um limite de 0,01 mg/L para cloro residual total (combinado + livre) a jusante das usinas, quando este corpo receptor for classificado como água doce de classe I, que atenda a padrões de abastecimento de consumo humano com tratamentos primários e proteção de comunidades aquáticas. A mesma legislação prevê limite de 250 mg/L de Cloretos para rios com classificação

Classe II que atendem às exigências anteriores e são destinados também ao abastecimento e consumo humano após tratamento primário, balneabilidade, e utilização em atividades agropecuárias (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2005).

Nos testes realizados no presente trabalho o Hipoclorito de Cálcio a 3ppm apresentou 68,95% de eficiência no controle do crescimento de bactérias no teste de disco difusão (Figura 27) e 75,57% no teste em meio líquido (Figura 28) quando comparado aos controles Positivo e Negativo respectivamente, mas atualmente buscam-se novas moléculas para evitar a utilização deste composto em sistemas abertos, onde existe a possibilidade de Cloro livre ser descartado em águas naturais (LIU *et al.*, 2011; HONG *et al.*, 2007).

A prevenção e tratamento da biocorrosão possuem como principal característica a redução e controle do desenvolvimento de biofilmes. Os tratamentos químicos aplicados no controle de biofilmes envolvem a utilização de agentes de controle microbiano (Biocidas) e outras substâncias agentes penetrantes, adsorventes e entre outros para auxiliar a penetração e dispersão destes compostos visando aumentar a eficiência no tratamento (GUIAMET, GÓMEZ DE SARAVIA, 2005).

Os critérios para a seleção de um bom agente de controle microbiológico são resumidos da seguinte maneira: 1) controle eficaz dos micro-organismos de forma geral, 2) poder de penetração e desestabilização de biofilmes maduros, 3) estabilidade físico-química com outros produtos, ex. agentes inibidores de corrosão e fatores ambientais (pH, temperatura, etc.), 4) baixo risco de manipulação e fácil armazenamento, 5) Biodegradável, 6) baixo custo (GAYLARDE, VIDELA, 1992).

Três critérios são muito importantes atualmente: eficiência, toxicidade e biodegradabilidade e devido a isto buscam-se de novas fontes, principalmente naturais, de compostos para o controle de micro-organismos em tubulações e sistemas de resfriamento (GUIAMET, GÓMEZ DE SARAVIA 2005). São inúmeras plantas, óleos e extratos alcoólicos e aquosos de plantas com efeitos antimicrobianos (HEISEY, GORMAN, 1992; MASOOD, *et al.*, 1994; BARANOWSKI *et al.*, 2006;



GILLIVER, OSBORN, 1994; KRISHNA, BANERJEE, 1999; CAMPS *et al.*, 2011; LAVANIA *et al.*, 2011; PRABHAKAR *et al.*, 2010).

Estes compostos foram eficientes tanto quanto água sanitária a 3ppm (Figura 27 e Figura 28), que é utilizado como sanitizante de superfícies. Normalmente são aplicados em Usinas Hidrelétricas produtos com o mesmo princípio de ação que a água sanitária, tais como Hipoclorito de Cálcio, Hipoclorito de Sódio, Dicloro, Cloro gasoso, Dicloroisocianurato de Sódio, além de outros compostos químicos tais como Hidróxido de Sódio, Ozônio, sulfato de Cobre e pinturas anti-incrustantes (GIORDANI *et al.*, 2005), os compostos a base de cloro seguem legislação ambiental que prevê um limite de 0,01 mg/L para cloro residual total (combinado + livre) a jusante das usinas quando este corpo receptor for classificado como água doce de classe I, ou seja, que atenda a padrões de abastecimento de consumo humano com tratamentos primários e proteção de comunidades aquáticas, ou limite de 250 mg/L de Cloretos para rios com classificação Classe II que atendem às exigências anteriores e são destinados também ao abastecimento e consumo humano após tratamento primário, balneabilidade, e utilização em atividades agropecuárias (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2005).

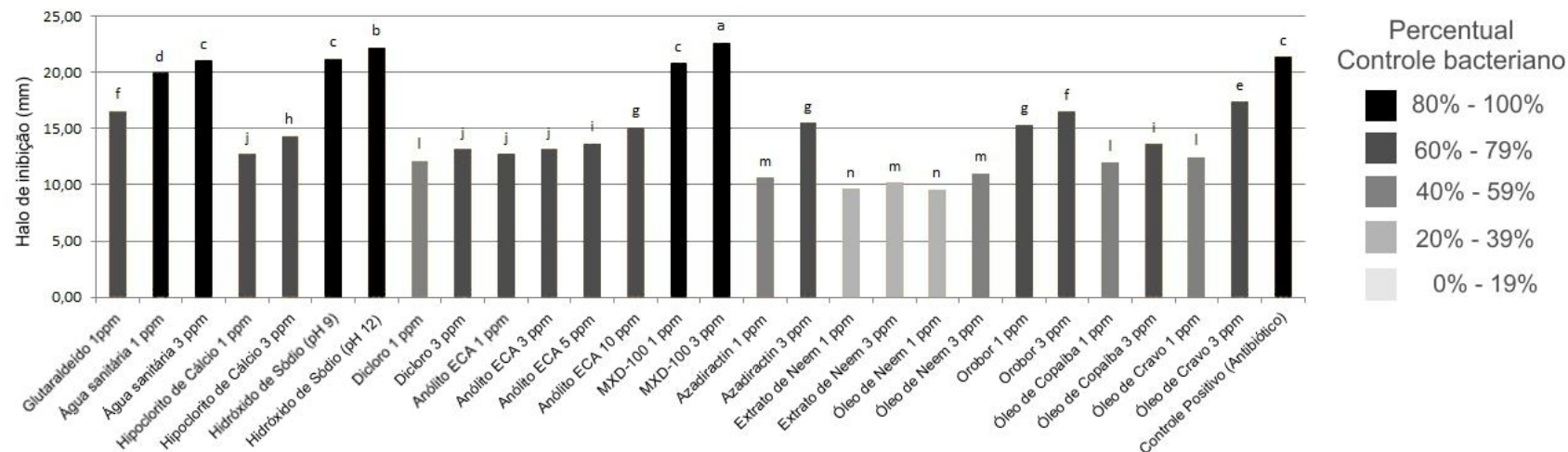


Figura 27 – Sensibilidade de bactérias a agentes de controle microbiológico em meio sólido – teste de disco difusão.

\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0.01$ )

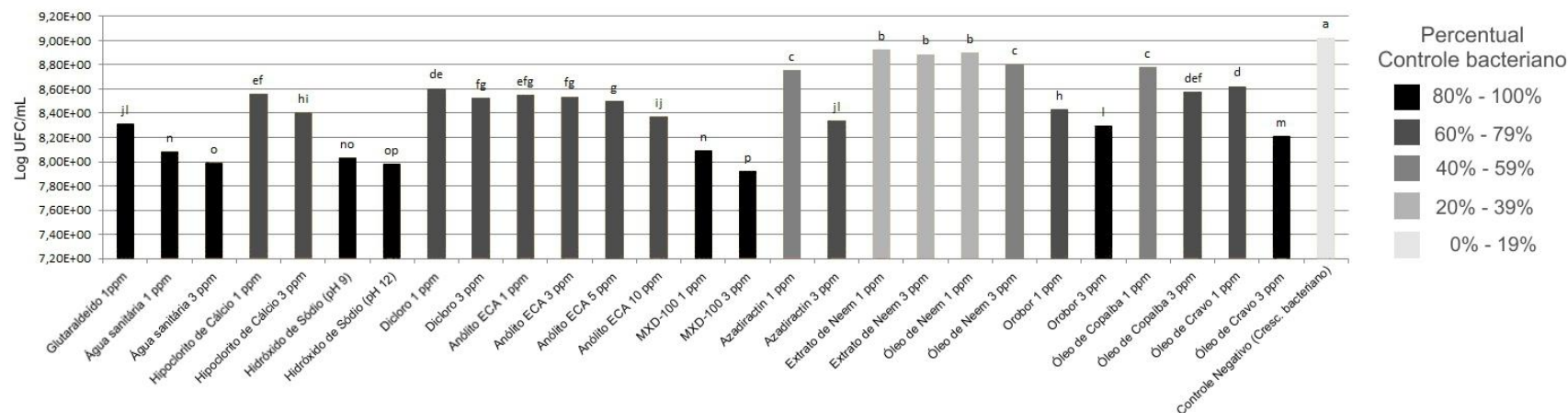


Figura 28 - Sensibilidade de bactérias a agentes de controle microbiológico em meio líquido – Turbidimetria

\* Significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0.01$ )

Em sistemas fechados pode ser utilizado Glutaraldeído, porém este composto apresenta grande toxicidade, assim, neste trabalho, o mesmo foi utilizado apenas para fins de comparação, uma vez que é normalmente empregado a 50ppm em sistemas de torre de resfriamento, onde não existe circulação aberta (SONDOSSI, 2004). Este composto apresentou 76,76% de eficiência na concentração de 1ppm (Figura 27) e 80,40% em meio líquido (Figura 28). No entanto a utilização do anólito do sistema de água eletrificada da “Radical Water” a 10ppm (Figura 27 e Figura 28) mostrou-se um potencial substituto ao Hipoclorito de Cálcio no controle da formação de biofilmes em Usinas Hidrelétricas. Seu princípio ativo é baseado na ação do ácido hipocloroso, que é menos nocivo que o hipoclorito, e não necessita de armazenamento de nenhum produto químico, como Hidróxido de Sódio. Sua produção é baseada na eletrólise da água e necessita apenas de energia elétrica e solução condutora de NaCl a 2,5% livre de iodo (THANTSHA, CLOETE, 2006), as Usinas hidrelétricas possuem períodos de baixa de produção de energia elétrica devido à redução de demanda durante períodos noturnos, por exemplo, e as turbinas funcionam em modo de “stand by” e portanto, a energia necessária para a eletrólise da água poderia ser otimizada utilizando esta energia. A eficiência de controle das bactérias testadas no teste de disco difusão e meio líquido foram respectivamente 72,09% (Figura 27) e 77,62% (Figura 28), que são resultados próximos aos obtidos com o Hipoclorito de Cálcio que atualmente é utilizado por Usinas hidrelétricas para o controle de incrustações.

A adição de solução de Hidróxido de Sódio 50% para alteração de pH da solução para pH 9 resultou na redução do crescimento de bactérias no teste de disco difusão em 85,81% (Figura 27) e no teste em meio líquido foi de 89,75% (Figura 28).

O Produto MXD-10 comparativamente foi o que apresentou os melhores resultados no controle do crescimento das bactérias nos testes de disco difusão e turbidimetria em meio líquido, foi observado respectivamente 87,57% (Figura 27) de redução no crescimento em meio sólido utilizando concentração de 3ppm e 92,06% (Figura 28) em meio líquido utilizando a mesma concentração.

Outros compostos baseados em fontes naturais mostraram eficiência na redução do crescimento das bactérias nos testes de disco difusão e turbidimetria: Azadiractin 3ppm (respectivamente 73,52% e 79,37%), Orobor 3ppm (respectivamente 76,49% e

81,29%), Óleo de Cravo 3ppm (respectivamente 78,81% e 84,49%) mas são necessários mais estudos para viabilizar sua utilização em sistemas industriais, visando contornar problemas como seu custo e/ou solubilidade em água (Figura 27 e Figura 28).

A maior parte das usinas hidrelétricas utilizam o Hipoclorito de Cálcio como agente de controle de incrustações e sanitizante dos sistemas de resfriamento (GIORDANI *et al.*, 2005; MÄDER NETTO, 2011). Este composto atualmente sofre algumas restrições devido à capacidade de formar trihalometanos e ácidos Haloacéticos na presença de cloro residual com matéria orgânica (HONG *et al.*, 2007; XUE *et al.*, 2009; HONG *et al.*, 2013; PALACIOS *et al.*, 2000; GAGNON *et al.*, 2005), sendo potenciais agentes carcinogênicos (LIU *et al.*, 2011; TAKANASHI *et al.*, 2001).

O mecanismo de ação do cloro quando adicionado à água segue a seguinte reação:  $\text{Cl}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HOCl} + \text{HCl}$  com formação de ácido hipocloroso, HOCl, e ácido clorídrico. O HOCl se dissocia em íon  $\text{H}^+$  e íon  $\text{ClO}^-$ , hipoclorito, que é o agente oxidante ativo. A ação oxidante do hipoclorito mais efetiva em valores de pH entre 6,5 e 7,5, tornando-se não efetiva acima de pH 9. Este composto reage rapidamente com redutores inorgânicos, como sulfetos, sulfitos, e nitritos, além de matéria orgânica (GENTIL, 2011; LÓPEZ-GALINDO, *et al.*, 2010). Alguns trabalhos evidenciam a formação destes compostos em águas naturais, tanto em ambiente marinho (LÓPEZ-GALINDO *et al.*, 2010) quanto em água doce (HONG *et al.*, 2013), mas principalmente em sistemas de tratamento de água tanto para consumo humano quanto para utilização em sistemas de resfriamento industrial (LÓPEZ-GALINDO *et al.*, 2010; EGUÍA *et al.*, 2008b; SRIYUTHA MURTHY *et al.*, 2005; GAGNON *et al.*, 2005).

Os resultados observados neste trabalho sugerem potenciais alternativas ao uso de Hipoclorito de Cálcio no tratamento primário e melhoria de águas naturais que são utilizadas no sistema de resfriamento de Usina Hidrelétrica situada na região norte do Brasil. A substituição deste composto por produtos, como MXD-100, anólito ECA e NaOH, que possuem melhor eficiência no controle de biofilmes pode auxiliar na redução de custos com manutenções e reparos nos equipamentos imersos ou em contato com águas naturais, além de melhorar a qualidade da água lançada à jusante da Usina e que atende a população local.

## **CAPÍTULO 5 - DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE DISPOSITIVO PARA MONITORAMENTO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM SUPERFÍCIE METÁLICA**

*Pedido de Patente nº BR 10 2013 026485 7 em 14/10/2013, Depositante Centrais Elétricas do Norte do Brasil SA – Eletrobrás/Eletronorte (ANEXO A)*

Serão apresentadas as metodologias e resultados relacionados à sensibilização dos micro-organismos formadores de biofilme contra potenciais biocidas de origem química e de fontes naturais.

### **5.1 Descrição da Patente do sistema para formação de biofilme**

"SISTEMA EM FLUXO CONTÍNUO PARA MONITORAMENTO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM SUBSTRATO SÓLIDO POR TÉCNICAS MICROSCÓPICAS E ELETROQUÍMICAS"

Refere-se a presente patente de invenção a um sistema de monitoramento em geral, mais especificamente a um sistema em fluxo contínuo para monitoramento da formação de biofilme em substrato sólido por técnicas microscópicas e eletroquímicas que, de acordo com as suas características gerais, possui como princípio básico propiciar a formação de um sistema em fluxo contínuo de monitoramento em estrutura própria e específica que permite análises microscópicas e espectroscopia por infravermelho dos micro-organismos aderidos à superfície alvo além de análises eletroquímicas das alterações na interfase substrato sólido/líquido circulante - formação de biofilme sobre substrato sólido, com vistas a possibilitar de forma extremamente prática, segura e precisa uma completa otimização no conjunto de procedimentos destinados a avaliar o padrão de adesão e evolução do biofilme utilizam-se técnicas microscópicas e espectroscopia por infravermelho e eletroquímicas que permitem identificar os parâmetros importantes no processo de colonização e maturação do biofilme sobre os substratos sólidos, ou seja, auxiliar as pesquisas e o desenvolvimento de estratégias para o controle da corrosão de superfícies influenciada por micro-organismos e, tendo como base, um sistema em

fluxo contínuo de monitoramento com grande resistência, segurança e versatilidade. Com design e formato específico e de fácil acesso para melhor adaptação e segurança dos usuários, características de praticidade no manuseio e funcionalidade, de custos bastante acessíveis e, devido as suas características gerais e dimensões, facilmente adaptável a uma vasta gama de biofilmes, substratos sólidos, locais e usuários em geral, independentes das características que estes apresentem.

Nos dias atuais, biofilme pode ser definido como um consórcio de organismos sobre um substrato e seus materiais extracelulares secretados no meio, sendo a sua formação um processo em que um substrato deve ser colonizado por tais organismos e a deposição de material orgânico produzido pelos mesmos fornece suporte e nutrientes para uma grande variedade de seres, principalmente micro-organismos. Esta deposição, também conhecida como bioincrustação, sofre grande influência de micro-organismos, pois estes possuem a habilidade de excretar material exopolimérico (MPE - material polimérico extracelular ou EPS - *extracellular polymeric substances*) formando agregados polimicrobianos. Em um biofilme, que pode ser um filme, floco ou lama, os micro-organismos representam menos de dez por cento da massa seca, enquanto a matriz polimérica pode representar até noventa por cento.

A presença de micro-organismos e seus metabólitos (MPE) podem desencadear vários processos como, por exemplo, corrosão influenciada por micro-organismos (CIM), entupimentos e incrustações. Existe uma maior resistência microbiana à ação de biocidas ou biostáticos em biofilmes do que pelos micro-organismos de vida livre (Planctônicos), podendo acarretar problemas sérios em determinados setores industriais ou da saúde. Os estudos dos mecanismos envolvidos neste processo fornecem suporte para que estratégias mais efetivas possam ser traçadas e efetivamente atingir estes micro-organismos podendo, assim, estabelecer um controle eficaz e evitar os problemas decorrentes da formação de biofilmes.

Contudo, cabe ressaltar que, nem todos os biofilmes são deletérios, existem vários trabalhos na literatura sobre processos que utilizam a formação de biofilmes para ganho de rendimento em processos, aproveitando a dinâmica da agregação de micro-organismos para aumentar a eficiência na conversão de compostos como, por

exemplo, no tratamento de efluentes e remoção de poluentes em estações de tratamento de resíduos urbanos.

A formação de biofilmes microbianos é uma resposta a estímulos externos do meio ambiente, onde estes micro-organismos estão inseridos, através de várias estratégias: aglomeração, lípase bacteriana, virulência, formação de biofilme, entre outras. Uma resposta atualmente bastante estudada é o *Quorum Sensing* (QS) que pode influenciar todas as características citadas anteriormente.

Esta adesão microbiana é dependente de uma cadeia de fatores que são conjugados ao mesmo tempo e coordenada por um objetivo comum, a sobrevivência da "comunidade microbiana". A busca por um substrato para fixar-se e o adensamento da população dará origem ao biofilme que fornecerá proteção e maiores possibilidades de resistência a processos de limpeza e desinfecção. A ligação destas células ao substrato ocorre devido a forças eletrostáticas, deposição de material orgânico e secreção de material polimérico extracelular (MPE). São encontradas também estruturas na membrana de bactérias que contribuem para o processo de adesão, como os vários tipos de adesinas e moléculas receptoras. Normalmente estas moléculas são componentes de filamentos, "pili" ou "fímbrias", ou proteínas multiméricas ancoradas na membrana bacteriana. Além das estruturas proteicas encontram-se lipopolissacarídeos (LPS) sintetizados por bactérias Gram-negativas e ácidos lipoteicóicos em algumas bactérias Gram-positivas, que também funcionam como moléculas de adesão. Outro componente importante para a adesão microbiana é a presença de glicocálix, que representa a matriz polissacarídica que envolve as células individualmente.

O comportamento das bactérias sésseis é diferente daquele apresentado por bactérias de vida livre e das cultivadas em meios seletivos de isolamento. O metabolismo bacteriano é diferenciado devido à presença de outros micro-organismos e da nova condição adotada (fixação em superfície). Exemplos de modificações do metabolismo são produção de metabólitos poliméricos (MPE) secretados por estes micro-organismos e modificações no nível de secreção de fatores responsáveis pelo *Quorum Sensing* (QS). A bioincrustação pode ocorrer tanto em fluxos turbulentos

como em águas paradas, sobre diversos tipos de superfícies, metálicas ou não, lisas ou em fissuras (crevices).

A geometria e componentes de medição e controle em dispositivos para formação de biofilme em condições controladas são variados, normalmente direcionados a uma utilização específica podendo estar acoplados para avaliação *in situ* ou para formação *ex situ* e análises separadas em laboratório. Além disso, o tipo de cultivo depende da forma do reator, sendo três possíveis configurações para cultivo de micro-organismos: cultivo em batelada, cultivo contínuo (CSTR) e *plug and flow* (PFR) e descontínuo. No primeiro o cultivo ocorre até o consumo dos nutrientes ou evolução das condições de cultivo para condições desfavoráveis ao crescimento: metabolitos tóxicos gerados por consequência do crescimento microbiológico, competição e pressão populacional, características físicas (pH, temperatura, etc.). Os cultivos CSTR e PFR ocorrem com reciclo contínuo de nutrientes e retirada de produto, sendo que no primeiro ocorre uma homogeneização eficiente do sistema e no segundo esta homogeneização ocorre por difusão devido ao movimento (fluxo) no sistema (reator). Devido à circulação de nutrientes constante no sistema, as bactérias planctônicas são "lavadas" e as aderidas são as com maior possibilidade de crescimento, mas o crescimento e alteração das bactérias não aderidas (planctônicas) também podem ocorrer. No cultivo descontínuo ocorre reposição e retirada de compostos que podem ser tóxicos ao desenvolvimento dos micro-organismos durante o cultivo (DORAN, 1995).

Em uma ampla análise da literatura com o intuito de se estabelecer o estado da técnica vigente frente ao sistema em fluxo contínuo para monitoramento da formação de biofilme em substrato sólido por técnicas microscópicas e eletroquímicas, objeto da presente patente, não foram revelados documentos relevantes ao estado da técnica que relacionem o objeto específico reivindicado na presente patente, ou seja, um sistema em fluxo contínuo para monitoramento da formação de biofilme em substrato sólido, contudo foram revelados alguns documentos secundários que cabem serem referenciados apesar de não serem impeditivos frente a presente patente.

A Patente WO 02/10434 (SMITH *et al.*, 2002) é relativa a um dispositivo para crescimento de biofilme compreendendo uma câmara. Nesta câmara são instalados



doze corpos de prova de aço inox em doze espaços isolados e onde é circulado o meio de cultivo e ocorre a adesão e avaliação de agentes de controle da formação de biofilmes. São coletadas amostras (um – dois mililitros) do meio descartado, é realizado monitoramento da densidade óptica, consequentemente avaliação do crescimento microbiológico. Cada grupo de três câmaras (amostra em duplicata e controle negativo) possui uma bomba peristáltica, no equipamento existem quatro grupos e, portanto são quatro bombas controladoras trabalhando a mesma velocidade. Quando é finalizada a análise, o sistema é interrompido e as amostras são substituídas, sendo os corpos-de-prova empregados no sistema diretamente encaminhados para coloração (fixação) e análise microscópica.

Segundo Bayoudh et. al. (2008), é possível realizar análise eletroquímica da adesão microbiológica sobre superfícies utilizando-se câmaras com soluções em fluxo contínuo, sendo que, para o experimento utilizaram uma câmara, eletrodo trabalho de vidro condutor (*idium-tin-oxide* - ITO), acessos para o contra eletrodo (fio de platina) e eletrodo referência, entrada e saída de solução e meio de cultivo, e espaço central para microscopia devido à constituição do equipamento ser baseada em materiais transparentes. A câmara é vedada, pois, entre as placas de Plexiglas existe uma membrana de silicone e todo o sistema é fechado utilizando-se parafusos para manter o sistema isolado. As medidas de concentração de bactérias por centímetro quadrado do eletrodo (área total de um ponto quatro centímetros quadrado) foram realizadas utilizando-se microscópio invertido equipado com objetiva de trinta e duas vezes, de modo a possibilitar a obtenção de imagens que posteriormente foram analisadas utilizando-se programa específico para avaliação da superfície recoberta.

O artigo apresentado por Ben-Yoav et. al. (2011) utiliza uma câmara elíptica para o estudo da cinética de adesão de diferentes espécies bacterianas em diversos materiais, sendo que, a mesma foi construída em polímero transparente (Perspex) e possui espaço para eletrodos de vidro condutor (ITO) com quatro centímetros quadrados de superfície cada, vedação com silicone e conexão com a bomba peristáltica para circulação constante de meio de cultivo. O sistema permite caracterização microscópica devido às paredes e os eletrodos trabalho serem em materiais transparentes, dessa maneira o trabalho utilizou microscópio invertido com lente objetiva de cinquenta vezes para avaliar o grau de recobrimento da superfície.

A adesão das bactérias foi monitorada através da espectroscopia por impedância devido à condutividade do eletrodo de ITO.

Um reator em fluxo para formação de biofilme foi utilizado por Mitchell et. al. (2008) onde este sistema utiliza uma coluna recheada com setenta gramas de areia peneirada (grânulos com um – dois milímetros) para utilização como suporte ao crescimento dos micro-organismos de interesse e formação do biofilme, sendo que, o sistema é composto de reservatório de meio de cultivo fresco, bomba peristáltica, conexão de entrada abaixo da coluna (funcionalmente vertical com deslocamento ascendente do material circulante) e reservatório de descarte do material circulante. O monitoramento do desenvolvimento do biofilme foi realizado utilizando-se à análise do número de células viáveis no efluente do sistema e das bactérias aderidas na matriz da coluna. Para análise do efluente, alíquotas foram coletadas e semeadas em meio de cultivo para que pudessem proceder à contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) em cada amostra, que significa UFC em doze horas de cultivo sob determinadas condições de operação citadas no trabalho. Já o material aderido à matriz da coluna foi tratado com tampões e soluções para recuperar todo o inóculo, de modo a evitar diferenças nas análises e expressão dos resultados em UFC/amostra.

Nigaud et. al. (2010) estudaram as modificações no proteoma de células livres (planctônicas) de bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa* utilizando biorreator de duas câmaras: câmara de biofilme (duzentos e oitenta mililitros) e câmara de células livres (oitenta mililitros), separadas por membrana de microporos (membrana Millipore com poros de ponto quarenta e cinco micrometro e porosidade de ponto setenta e nove) com vinte e oito centímetros quadrados de área. A Câmara de biofilme possui lâ de vidro para suporte da formação de biofilme e a câmara de células livres é mantida sob agitação através de um agitador magnético e todo o sistema trabalha a uma temperatura de trinta e sete graus Celsius.

Perni et. al. (2006) utilizou um sistema de cultivo de biofilme para avaliar o desenvolvimento de *Listeria innocua* em regimes turbulentos de fluxo, sendo que, o sistema compreende um reator (dois litros) mantido a trinta graus Celsius através de um banho com controle de temperatura e sob agitação através de impelidores do tipo

pá com rotação de duzentas rotações por minuto. O sistema trabalha em pH 7 através da adição de 0,2M NaOH ou 0,2M HCl. Para injeção de ar, existe um pré-filtro e um filtro esterilizante na linha de injeção antes do borbulhamento no meio a uma taxa de um ponto três litros por minuto. O Objetivo deste trabalho era avaliar a formação do biofilme em regime turbulento, portanto na sequência do biorreator existem secções para os testes de fluxo e para a recirculação utilizaram uma bomba centrifuga. Os tubos foram confeccionados em aço inox e possuem válvulas do tipo globo e entre as válvulas e os tubos existem medidores de vazão para o controle das condições de passagem e dessa forma realizar a alteração do regime de fluxo laminar-turbulento.

É conhecido o equipamento *CDC biofilm reactor* (Reator de biofilme CDC – *Center for Disease Control*), que é constituído por um reator de vidro com tampa de polietileno suportando oito varetas de polipropileno, que contêm três corpos de prova de propileno onde os biofilmes podem se desenvolver. Estas varetas estão orientadas de forma que o fluxo (agitação magnética no interior do reator cilíndrico de vidro) passa perpendicular às amostras. Este equipamento possui reconhecimento da "*American Society for Testing and Material (ASTM) standard method E2562-07: Standard Test Method for quantification of Pseudomonas aeruginosa Biofilm Growth with High shear and Continuous Flow using CDC Biofilm Reactor*" (ASTM, 2012c) para avaliação do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* em cultivo contínuo. Este reator permite o crescimento de vinte e quatro discos de polipropileno com biofilme idêntico e estes podem ser removidos durante o cultivo, para testes de crescimento ou remoção (desinfecção e limpeza). O volume de operação é de quinhentos a mililitros e atualmente é muito utilizado para testes de antibióticos e teste de adesão em materiais.

A patente de invenção PI1000751-2 "Estação de Avaliação e Monitoramento de Corrosão Microbiológica e Eletroquímica em Rios e Similares" (BERTON, GARCIA, 2010) trata de um sistema para monitoramento de superfícies metálicas *in situ* através da utilização de dois tipos de corpos de prova (CP's) (eletroquímico e microbiológico) que permitem o monitoramento da bioincrustação e formação de biofilme através da exposição destes CP's a ação direta e constante de água do próprio reservatório de uma usina hidrelétrica ou rio em estudo. A patente se refere a inovações com relação ao monitoramento eletroquímico, onde a estação, devido a sua geometria, fornece

condições favoráveis à avaliação de parâmetros *in situ* importantes para cálculo de taxa de corrosão nos corpos de prova, e consequentemente os metais, expostos a ação e influência da água dos rios e reservatórios. Os CP's para análise microbiológica permitem, através de protocolos específicos, o isolamento dos micro-organismos aderidos na superfície do metal e avaliação da evolução da formação de biofilme utilizando-se corpos de prova de diversos metais. Este dispositivo trabalha sob condições ambientais sem controle de parâmetros físicos, reproduzindo as condições ambientais que estão expostos os materiais e superfícies de interesse. Este sistema trabalha normalmente com água natural do ambiente de estudo e os CP's são confeccionados conforme especificações da patente.

Desta forma, a concepção geral do presente sistema em fluxo contínuo para monitoramento da formação de biofilme em substrato sólido por técnicas microscópicas e eletroquímicas, objeto da presente patente, é baseada totalmente na sua estruturação simples e robusta com um mínimo necessário de componentes e operacionalidade extremamente simplificada, segura e otimizada, aliado aos procedimentos de manufatura e manutenção bastante práticos, de modo a gerar um sistema em fluxo contínuo de monitoramento prático e eficiente para monitoramento da formação de biofilme sobre substrato sólido através de análises microscópicas e espectroscopia por infravermelho dos micro-organismos aderidos à superfície alvo e análises eletroquímicas das alterações na interfase substrato sólido/líquido circulante, de modo a permitir a identificação de parâmetros importantes no processo de colonização e maturação do biofilme sobre os substratos sólidos.

Na avaliação do padrão de adesão e evolução do biofilme em substrato sólido utilizando-se técnicas microscópicas e espectroscopia por infravermelho e técnicas eletroquímicas pode-se monitorar: tempo de evolução do biofilme; grau de recobrimento da superfície do substrato sólido pelo biofilme; interferência na interfase substrato sólido/meio líquido; deposição de metabólitos sobre a superfície do substrato sólido; modificação do meio líquido circundante; tipo de biofilme formado; e relação com o micro-organismo envolvido na formação do biofilme.

A patente em apreço caracteriza-se por reunir componentes e processos em uma concepção diferenciada, a qual atenderá as diversas exigências que a natureza

da utilização demanda, ou seja, monitoramento da formação de biofilme sobre substrato sólido. Concepção esta que garante um sistema em fluxo contínuo de monitoramento de grande eficiência, funcionalidade, resistência, durabilidade, segurança, versatilidade, estabilidade e precisão em razão das excelentes qualidades técnicas agregadas, o que proporciona vantagens e melhoras nas pesquisas e no desenvolvimento de estratégias para o controle da corrosão de superfícies influenciadas por micro-organismos em geral e, cujas características gerais, diferem das demais formas e modelos conhecidos pelo atual estado da técnica.

A presente patente consiste no emprego de um moderno, eficiente, seguro e funcional sistema em fluxo contínuo para monitoramento da formação de biofilme em substrato sólido por técnicas microscópicas e eletroquímicas formado por um conjunto de soluções físico-químicas corretamente incorporadas, compondo um sistema em fluxo contínuo de monitoramento completo e diferenciado com design exclusivo e características próprias, que incorpora uma estrutura própria e específica do tipo eletromecânica, de elevada durabilidade e resistência e contendo perfeitamente integrados e simetricamente dispostos entre si uma câmara de mistura como elemento de homogeneização do meio circulante e o agente biocida ou biostático; uma câmara de cultivo e monitoramento como elemento de cultivo e monitoramento dos corpos-de-prova; uma bomba peristáltica como elemento de injeção do meio de cultivo, inóculo e agente biocida ou biostático; um conjunto de aquecimento como elemento de homogeneização da temperatura do reservatório de meio de cultivo esterilizado; um reservatório esterilizado como elemento de acondicionamento do meio de cultivo esterilizado e livre de contaminação; um reservatório de inóculo como elemento de acondicionamento do inóculo – micro-organismo de interesse; um reservatório como elemento de acondicionamento do agente de controle biocida ou biostático; um reservatório descarte como elemento de descarte do meio consumido, células velhas e debris celulares; e um sistema de medidas eletroquímicas e aquisição de dados *in situ* como elemento de controle dos testes eletroquímicos e avaliação da interfase substrato sólido/ meio líquido circulante, de modo a viabilizar a formação de um conjunto único, completo e seguro, cujas formas e disposições internas e externas possibilitam a perfeita adaptação a uma vasta gama de biofilmes em substratos sólidos em geral, sendo especialmente projetado para estes fins.

O presente sistema em fluxo contínuo de monitoramento baseia-se na aplicação de componentes e processos em uma concepção diferenciada, sem, no entanto, atingir um alto grau de sofisticação e complexibilidade, tornando possível solucionar alguns dos principais inconvenientes das demais formas e modelos amplamente conhecidos pelo atual estado da técnica e empregados para monitoramento da formação de biofilme sobre substrato sólido, que se situam em uma faixa de trabalho na qual são frequentes dificuldades de utilização e aplicação, baixa eficiência e performance, insegurança, deterioração e fragilidade, pouca durabilidade e resistência, baixa versatilidade, imprecisão, trabalhosa na aplicação, elevadas perdas, custo elevado, manuseio complexo, elevada manutenção e grande desperdício de tempo.

**Os objetivos, vantagens e demais características importantes da patente em apreço poderão ser mais facilmente compreendidas quando lidas em conjunto com as figuras abaixo:**

A Figura 29 “Figura 1 na descrição da Patente” representa uma vista em perspectiva do sistema em fluxo contínuo para monitoramento da formação de biofilme em substrato sólido por técnicas microscópicas e eletroquímicas.

A Figura 30 “Figura 2 na descrição da Patente” representa uma vista em perspectiva superior da câmara de mistura e da câmara de cultivo e monitoramento do sistema em fluxo contínuo para monitoramento da formação de biofilme em substrato sólido por técnicas microscópicas e eletroquímicas.

A Figura 31 “Figura 3 na descrição da Patente” representa uma vista em perspectiva frontal da câmara de mistura do sistema em fluxo contínuo para monitoramento da formação de biofilme em substrato sólido por técnicas microscópicas e eletroquímicas.

A Figura 32 “Figura 4 na descrição da Patente” representa uma vista inferior da câmara de mistura do sistema em fluxo contínuo para monitoramento da formação de biofilme em substrato sólido por técnicas microscópicas e eletroquímicas.

A Figura 33 “Figura 5 na descrição da Patente” representa uma vista em perspectiva superior da câmara de cultivo e monitoramento do sistema em fluxo contínuo para monitoramento da formação de biofilme em substrato sólido por técnicas microscópicas e eletroquímicas.

A Figura 34 “Figura 6 na descrição da Patente” representa uma vista em perspectiva lateral da câmara de cultivo e monitoramento do sistema em fluxo contínuo para monitoramento da formação de biofilme em substrato sólido por técnicas microscópicas e eletroquímicas.

Como se infere nas figuras em anexo que ilustram e integram o presente relatório descritivo da patente de invenção de "Sistema em Fluxo Contínuo para Monitoramento da Formação de Biofilme em Substrato Sólido por Técnicas Microscópicas e Eletroquímicas", compreendido por um sistema em fluxo contínuo de monitoramento completo e de características próprias, que incorpora uma estrutura própria e específica contendo perfeitamente integrados e simetricamente dispostos entre si um agitador magnético (1) de formato geral cilíndrico e disposto vertical e simetricamente sobre uma superfície plana com a função primordial de manutenção da temperatura alvo e garantia de uma melhor homogeneização do sistema em fluxo contínuo de monitoramento; uma câmara de mistura (2) de formato geral paralelepipedal com geometria baseada em reatores do tipo *plug and flow* e disposta horizontal, paralela e simetricamente centrada sobre o agitador magnético (1) com a função primordial de preparação para o aquecimento que auxiliará na manutenção da temperatura alvo; uma câmara de cultivo e monitoramento (3) de formato geral paralelepipedal e disposta horizontal, paralela e simetricamente espaçada sobre a câmara de mistura (2), sendo que, em conjunto com a câmara de mistura (2) permite a circulação do meio de cultivo garantindo a característica de sistema em fluxo e homogêneo, com a função primordial de cultivo e monitoramento da formação de biofilme nos corpos-de-prova; uma bomba peristáltica (4) de formato geral paralelepipedal, disposta vertical e simetricamente adjacente ao agitador magnético (1) e baseada em micro-dosagem, sendo a vazão de injeção de cada componente ajustada mediante análise do balanço de massa e ajuste dos parâmetros necessários para o cultivo do micro-organismo alvo e a superfície analisada, com a função primordial de injeção do meio de cultivo, inóculo e agente biocida ou biostático; um conjunto de aquecimento indireto (5) de formato

geral paralelepipedal, disposto vertical e simetricamente adjacente ao agitador magnético (1) e a bomba peristáltica (4) e baseado em banho com controle eletrônico de temperatura e recirculação de água, com a função primordial de homogeneização da temperatura e manutenção da temperatura através do agitador magnético (1); um reservatório esterilizado (6) de formato geral cilíndrico, disposto vertical e simetricamente no interior do conjunto de aquecimento indireto (5) e tendo um bocal de abertura (6A) de formato geral cilíndrico e disposto vertical e simetricamente centrado na extremidade superior do reservatório esterilizado (6) e uma tampa lacre (6B) de formato geral cilíndrico com abertura central e disposto vertical e simetricamente ao redor do bocal de abertura (6A), sendo o reservatório esterilizado (6) livre de contaminação, isolado do ambiente externo e todos os componentes esterilizados em autoclave entre cento e vinte e cento e quarenta graus Celsius com uma atmosfera durante quinze a vinte minutos, com a função primordial de acondicionamento do meio de cultivo esterilizado e livre de contaminação; um reservatório inóculo (7) de formato geral cilíndrico, disposto vertical e simetricamente invertido na posição adjacente ao agitador magnético (1) e tendo um bocal de abertura (7A) de formato geral cilíndrico e disposto vertical e simetricamente centrado na extremidade superior do reservatório inóculo (7) e uma tampa lacre (7B) de formato geral cilíndrico com duas aberturas centrais e disposto vertical e simetricamente ao redor do bocal de abertura (7A), sendo a injeção do inóculo e vazão de entrada do meio de cultivo controladas através de análise do balanço de massa do sistema em fluxo contínuo de monitoramento - biorreator contínuo *plug and flow*, e dosadas através da bomba peristáltica (4) com micro-dosagem, com a função primordial de acondicionamento do inóculo – micro-organismo de interesse; um reservatório agente (8) de formato geral cilíndrico, disposto vertical e simetricamente invertido na posição adjacente ao reservatório inóculo (7) e tendo um bocal de abertura (8A) de formato geral cilíndrico e disposto vertical e simetricamente centrado na extremidade superior do reservatório agente (8) e uma tampa lacre (8B) de formato geral cilíndrico com abertura central e disposto vertical e simetricamente ao redor do bocal de abertura (8A), com a função primordial de acondicionamento do agente de controle biocida ou biostático e testes de controle e desagregação de biofilmes formados sobre superfícies e imersos em líquidos; um reservatório descarte (9) de formato geral cilíndrico, disposto vertical e simetricamente invertido na posição adjacente ao



agitador magnético (1) e tendo um bocal de abertura (9A) de formato geral cilíndrico e disposto vertical e simetricamente centrado na extremidade superior do reservatório descarte (9), uma tampa lacre (9B) de formato geral cilíndrico com abertura central e disposto vertical e simetricamente ao redor do bocal de abertura (9A) e uma saída de ar com filtro (9C) de formato geral cilíndrica e disposta vertical e simetricamente na tampa lacre (9B), com a função primordial de descarte do meio consumido, células velhas e debris celulares; um conjunto de mangueiras contendo uma mangueira (10A) interligando a entrada lateral (3A) da câmara de cultivo e monitoramento (3) à saída superior (2B) da câmara de mistura (2), uma mangueira (10B) interligando a saída superior (3B) da câmara de cultivo e monitoramento (3) à tampa lacre (9B) do reservatório descarte (9) realizando as retiradas de amostras para avaliação qualitativa e quantitativa dos micro-organismos, em desenvolvimento no sistema e na forma de vida *planctônica*, a partir da saída da câmara de cultivo e monitoramento (3), uma mangueira (10C) interligando a tampa lacre (6B) do reservatório esterilizado (6) à bomba peristáltica (4) com cobertura em material isolante de manutenção do calor necessário à temperatura de cultivo ( $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ), pois o reservatório esterilizado (6) permanece dentro do banho para aquecimento prévio do meio de cultivo que será circulado dentro do sistema em fluxo contínuo de monitoramento, duas mangueiras (10D) interligando a bomba peristáltica (4) à entrada lateral (2A) da câmara de mistura (2), e uma mangueira (10E) interligando a bomba peristáltica (4) à tampa lacre (7B) do reservatório inóculo (7); e um sistema de medidas eletroquímicas e aquisição de dados baseado em um microcomputador contendo um programa de computador de aplicação da perturbação de interesse e um programa de computador de aquisição dos dados da resposta à perturbação, e um potenciostato/galvanostato com módulo de impedância e interligado ao microcomputador como gerador de perturbação ao sistema, com a função primordial de realizar testes eletroquímicos e avaliações da interfase substrato sólido/líquido circulante.

A câmara de mistura (2) é constituída por uma entrada lateral (2A) de formato geral cilíndrica e disposta horizontal, perpendicular e simetricamente centrada em uma lateral da câmara de mistura (2) como entrada do meio de cultivo fresco ou inoculado na câmara de mistura (2), uma saída superior (2B) de formato geral cilíndrica e disposta vertical, perpendicular e simetricamente centrada na parte superior da

câmara de mistura (2) como saída do meio de cultivo fresco ou inoculado na câmara de mistura (2), quatro parafusos laterais com borboletas (2C) de formato gerais cilíndricos e dispostos verticais, paralelos e simetricamente transpassantes e espaçados nas extremidades da câmara de mistura (2) como estruturação da câmara de mistura (2), um impelidor magnético (2D) de formato geral oval e disposto horizontal , paralelo e simetricamente centrado na parte inferior da câmara de mistura (2) como agitador da câmara de mistura (2) e uma placa térmica com agitação magnética (2E) de formato geral circular e disposta horizontal, paralela e simetricamente centrada na parte inferior da câmara de mistura (2).

A câmara de cultivo e monitoramento (3) é constituída por uma entrada lateral (3A) de formato geral cilíndrica e disposta horizontal, perpendicular e simetricamente centrada na lateral esquerda da câmara de cultivo e monitoramento (3) como entrada do meio circulante desta, uma saída superior (3B) de formato geral cilíndrica e disposta vertical, perpendicular e simetricamente centrada na extremidade direita da câmara de cultivo e monitoramento (3) como saída do meio circulante desta, um conjunto de parafusos laterais com borboletas (3C) de formato gerais cilíndricos e dispostos verticais, paralelos e simetricamente transpassantes e espaçados ao longo das extremidades da câmara de cultivo e monitoramento (3) como estruturação da câmara de mistura (2), um conjunto de acessos (3D) de formatos gerais cilíndricas e dispostas verticais, paralelas e simetricamente espaçadas entre si sobre e ao longo da parte esquerda da câmara de cultivo e monitoramento (3) como receptáculos dos corpos-de-prova (3E), um conjunto de corpos-de-prova (3E) de formatos gerais cilíndricos em epóxi ou similar e cada qual disposto vertical e simetricamente encaixado sob pressão em um acesso (3D) garantindo a vedação do sistema na área de adesão e tendo um anel de vedação de borracha - O'Ring (3F) disposto simetricamente ao redor da extremidade superior do corpo-de-prova (3E) como avaliações microscópicas e espectroscopia por infravermelho, um eletrodo referência de fio de prata (Ag) (3G) de formato geral cilíndrico e disposto vertical e simetricamente adjacente a saída superior (3B) como avaliação eletroquímica, um eletrodo trabalho com superfície alvo (3H) de formato geral cilíndrico e disposto vertical e simetricamente entre o eletrodo referência de fio de prata (Ag) (3G) e a saída superior (3B) como avaliação eletroquímica e um eletrodo contra trabalho de platina

(Pt) (3I) de formato geral similar a um "L" e disposto vertical, perpendicular e simetricamente na face lateral da câmara de cultivo e monitoramento (3) adjacente a saída superior (3B) como avaliação eletroquímica.

A câmara de mistura (2) possui a função primordial de homogeneização do meio circulante (com ou sem inóculo de micro-organismos) e do agente biocida ou biostático, sendo que, a homogeneização ocorre devido à geometria da câmara de mistura (2) baseada em reatores do tipo *plug and flow*.

Na câmara de cultivo e monitoramento (3) os corpos de prova (3E) são utilizados para avaliações microbiológicas e espectroscopia por infravermelho, e os eletrodos referência de fio de prata (Ag) (3G), eletrodos trabalho com superfície alvo (3H) e eletrodos contra trabalho de platina (Pt) (3I) são utilizados para análises eletroquímicas.

No reservatório inóculo (7) o micro-organismo de interesse é cultivado previamente para aumento de população bacteriana até a concentração necessária para manutenção das Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL no sistema em fluxo contínuo de monitoramento. O pré-cultivo é realizado atendendo as necessidades metabólicas e fisiológicas do micro-organismo alvo e utilizando-se o mesmo meio de cultivo para circulação contínua no sistema em fluxo contínuo de monitoramento.

No reservatório agente (8) quando são realizados testes de controle da formação e desagregação de biofilmes formados sobre superfícies e imersos em líquidos a injeção é realizada através da bomba peristáltica (4) com micro-dosagem idêntica à utilizada nos bombeamentos de meio de cultivo fresco e inóculo.

No reservatório descarte (9), devido ao fluxo contínuo, todo material que entra será recolhido após a saída da câmara de cultivo e monitoramento (3), sendo que, a saída de ar com filtro (9C) controla a contaminação da área de cultivo, e o material coletado, após passagem pelo sistema em fluxo contínuo de monitoramento, é autoclavado e descartado. As retiradas de amostras para avaliação qualitativa e quantitativa dos micro-organismos, em desenvolvimento no sistema em fluxo contínuo

de monitoramento e na forma de vida *planctônica*, são realizadas através da mangueira acoplada na saída da câmara de cultivo e monitoramento (3).

No sistema de medidas eletroquímicas e aquisição de dados (10), destinado a testes eletroquímicos e avaliações da interfase substrato sólido/líquido circulante, os eletrodos (3G), (3H) e (3I) conectados à câmara de cultivo e monitoramento (3) são utilizados para as medições eletroquímicas onde se aplica uma perturbação no sistema (eletrodo/eletrolito) e se monitora a resposta. A perturbação pode ser uma tensão contínua com os valores sempre em relação a um eletrodo de referência, como por exemplo, um eletrodo de calomelano saturado (ou corrente contínua) e, neste caso, mede-se a resposta em corrente contínua (ou tensão contínua). A perturbação também pode ser em tensão alternada (ou corrente alternada) numa dada faixa apropriada de frequência, sobreposta à perturbação em tensão contínua (ou corrente contínua) e mede-se a resposta em corrente alternada (ou tensão alternada).

O sistema em fluxo contínuo para monitoramento da formação de biofilme em substrato sólido por técnicas microscópicas e eletroquímicas através de sua concepção permite identificar parâmetros importantes no processo de colonização e maturação do biofilme sobre o substrato sólido através do monitoramento: tempo de evolução; grau de recobrimento da superfície; interferência na interface/líquido; deposição de metabólicos sobre a superfície; modificação no meio líquido circundante; tipo de biofilme; e relação com o micro-organismo envolvido na formação.

O sistema em fluxo contínuo para monitoramento da formação de biofilme em substrato sólido por técnicas microscópicas e eletroquímicas através de sua concepção possibilita realizar: testes de adesão e desagregação de micro-organismos sobre as superfícies sólidas – compreendendo os mecanismos envolvidos na adesão e maturação de biofilmes; avaliação da interferência no desenvolvimento do biofilme (qualitativa e quantitativa) através da adição de produtos biocidas ou biostáticos (químicos ou biológicos); caracterização de micro-organismos e seu potencial de formação de biofilme; testes de meios de cultivo para monitoramento do padrão de crescimento; formação de metabólitos como, por exemplo, material polimérico extracelular – MPE; e compreensão dos fenômenos envolvidos no processo de corrosão influenciada por micro-organismos.

O sistema em fluxo contínuo para monitoramento da formação de biofilme em substrato sólido por técnicas microscópicas e eletroquímicas, por possuir os seus componentes totalmente integrados entre si, monta-se e desmonta-se rapidamente, nada se despresta e nada tem para quebrar ou entortar, alcança-se um alto índice de desempenho e eficiência, aliado a alta durabilidade e absoluta segurança. Depois de totalmente integrados entre si, os componentes ficam presos e coesos, impedindo desta maneira que se soltem sozinhos quando em uso, ficando o conjunto totalmente disponível para os procedimentos de análises microscópicas e espectroscopia por infravermelho dos micro-organismos aderidos à superfície alvo e análises eletroquímicas das alterações na interfase substrato sólido/líquido circulante - formação de biofilme sobre substrato sólido. Desta maneira, o sistema em fluxo contínuo de monitoramento pode ser utilizado sem preocupação de quaisquer naturezas, principalmente quanto à durabilidade e segurança dos seus componentes, assim como a segurança dos técnicos.

Pelo tudo que foi exposto trata-se de um sistema de monitoramento que será bem recebido pelos mais diversos segmentos em geral, pois o sistema em fluxo contínuo para monitoramento da formação de biofilme em substrato sólido por técnicas microscópicas e eletroquímicas apresenta inúmeras vantagens, tais como: grande segurança, confiabilidade e agilidade na aplicação; grande rendimento e performance na sua aplicação em virtude de sua concepção geral; elevado conforto, comodidade e segurança aos usuários; altíssima resistência e durabilidade geral, aliado a um baixo ou nenhum desgaste do conjunto como um todo; custos totalmente acessíveis o que possibilita uma ótima relação custo/benefício; prática e segura utilização por qualquer técnico; grande faixa de alcance; baixíssima e prática manutenção geral; perfeita e direta adaptação aos mais diversos tipos de biofilmes e substratos sólidos em geral; elevada precisão operacional; e a certeza de se ter um sistema de monitoramento que atenda plenamente as legislações e normas vigentes e as condições básicas necessárias a sua aplicação.

Todos estes atributos permitem classificar o sistema em fluxo contínuo para monitoramento da formação de biofilme em substrato sólido por técnicas microscópicas e eletroquímicas, como um meio totalmente versátil, eficiente, prático e seguro para auxiliar uma vasta gama de pesquisas e de desenvolvimento de

estratégias para o controle dos mais diversos tipos de corrosões dos mais diversos tipos de superfícies influenciadas por uma vasta gama de micro-organismos, ou seja, os processos de colonização e maturação dos mais diversos tipos de biofilmes sobre os mais diversos tipos de substratos sólidos, independente das características gerais que estes possam apresentar, sendo ainda de grande facilidade de aplicação e manuseio, aliada a grande performance e excelentes características gerais; contudo as medidas, dimensões e quantidades podem variar de acordo com as necessidades de cada aplicação.

## 5.2 REIVINDICAÇÃO

1.)"SISTEMA EM FLUXO CONTÍNUO PARA MONITORAMENTO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM SUBSTRATO SÓLIDO POR TÉCNICAS MICROSCÓPICAS E ELETROQUÍMICAS", caracterizado por ser compreendido por um sistema em fluxo contínuo de monitoramento que incorpora uma estrutura contendo integrados e simetricamente dispostos entre si um agitador magnético (1) de formato geral cilíndrico e disposto vertical e simetricamente sobre uma superfície plana; uma câmara de mistura (2) de formato geral paralelepipedal com geometria baseada em reatores do tipo *plug and flow* e disposta horizontal, paralela e simetricamente centrada sobre o agitador magnético (1); uma câmara de cultivo e monitoramento (3) de formato geral paralelepipedal e disposta horizontal, paralela e simetricamente espaçada sobre a câmara de mistura (2), sendo que, em conjunto com a câmara de mistura (2) forma o meio de cultivo; uma bomba peristáltica (4) de formato geral paralelepipedal, disposta vertical e simetricamente adjacente ao agitador magnético (1) e baseada em micro-dosagem, sendo a vazão de injeção de cada componente ajustada mediante análise do balanço de massa e ajuste dos parâmetros necessários para o cultivo do micro-organismo alvo e a superfície analisada; um conjunto de aquecimento indireto (5) de formato geral paralelepipedal, disposto vertical e simetricamente adjacente ao agitador magnético (1) e a bomba peristáltica (4) e baseado em banho com controle de eletrônico de temperatura e recirculação de água; um reservatório esterilizado (6) de formato geral cilíndrico, disposto vertical e simetricamente no interior do conjunto de aquecimento indireto (5) e tendo um bocal de abertura (6A) de formato geral cilíndrico e disposto vertical e simetricamente centrado na extremidade superior do reservatório esterilizado (6) e uma tampa lacre

(6B) de formato geral cilíndrico com abertura central e disposto vertical e simetricamente ao redor do bocal de abertura (6A), sendo o reservatório esterilizado (6) livre de contaminação, isolado do ambiente externo e todos os componentes esterilizados em autoclave entre cento e vinte e cento e quarenta graus Celsius com uma atmosfera durante quinze a vinte minutos; um reservatório inóculo (7) de formato geral cilíndrico, disposto vertical e simetricamente invertido na posição adjacente ao agitador magnético (1) e tendo um bocal de abertura (7A) de formato geral cilíndrico e disposto vertical e simetricamente centrado na extremidade superior do reservatório inóculo (7) e uma tampa lacre (7B) de formato geral cilíndrico com duas aberturas centrais e disposto vertical e simetricamente ao redor do bocal de abertura (7A), sendo a injeção do inóculo e vazão de entrada do meio de cultivo controladas através de análise do balanço de massa do sistema em fluxo contínuo de monitoramento - biorreator contínuo *plug and flow*, e dosadas através da bomba peristáltica (4) com micro-dosagem; um reservatório agente (8) de formato geral cilíndrico, disposto vertical e simetricamente invertido na posição adjacente ao reservatório inóculo (7) e tendo um bocal de abertura (8A) de formato geral cilíndrico e disposto vertical e simetricamente centrado na extremidade superior do reservatório agente (8) e uma tampa lacre (8B) de formato geral cilíndrico com abertura central e disposto vertical e simetricamente ao redor do bocal de abertura (8A); um reservatório descarte (9) de formato geral cilíndrico, disposto vertical e simetricamente invertido na posição adjacente ao agitador magnético (1) e tendo um bocal de abertura (9A) de formato geral cilíndrico e disposto vertical e simetricamente centrado na extremidade superior do reservatório descarte (9), uma tampa lacre (9B) de formato geral cilíndrico com abertura central e disposto vertical e simetricamente ao redor do bocal de abertura (9A) e uma saída de ar com filtro (9C) de formato geral cilíndrica e disposta vertical e simetricamente na tampa lacre (9B); um conjunto de mangueiras contendo uma mangueira (10A) interligando a entrada lateral (3A) da câmara de cultivo e monitoramento (3) à saída superior (2B) da câmara de mistura (2), uma mangueira (10B) interligando a saída superior (3B) da câmara de cultivo e monitoramento (3) à tampa lacre (9B) do reservatório descarte (9) de retiradas de amostras na avaliação qualitativa e quantitativa dos micro-organismos, em desenvolvimento no sistema e na forma de vida *planctônica*, a partir da saída da câmara de cultivo e monitoramento (3), uma mangueira (10C) interligando a tampa lacre (6B) do reservatório esterilizado (6)

à bomba peristáltica (4) com cobertura em material isolante de manutenção do calor necessário à temperatura de cultivo ( $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ), pois o reservatório esterilizado (6) permanece dentro do banho para aquecimento prévio do meio de cultivo que será circulado dentro do sistema em fluxo contínuo de monitoramento, duas mangueiras (10D) interligando a bomba peristáltica (4) à entrada lateral (2A) da câmara de mistura (2), e uma mangueira (10E) interligando a bomba peristáltica (4) à tampa lacre (7B) do reservatório inóculo (7); e um sistema de medidas eletroquímicas e aquisição de dados baseado em um microcomputador contendo um programa de computador de aplicação da perturbação de interesse e um programa de computador de aquisição dos dados da resposta à perturbação, e um potenciostato/galvanostato com módulo de impedância e interligado ao microcomputador como gerador de perturbação ao sistema; sendo que, a câmara de mistura (2) é constituída por uma entrada lateral (2A) de formato geral cilíndrica e disposta horizontal, perpendicular e simetricamente centrada em uma lateral da câmara de mistura (2) como entrada do meio de cultivo fresco ou inoculado na câmara de mistura (2), uma saída superior (2B) de formato geral cilíndrica e disposta vertical, perpendicular e simetricamente centrada na parte superior da câmara de mistura (2) como saída do meio de cultivo fresco ou inoculado na câmara de mistura (2), quatro parafusos laterais com borboletas (2C) de formato gerais cilíndricos e dispostos verticais, paralelos e simetricamente transpassantes e espaçados nas extremidades da câmara de mistura (2), um impelidor (2D) de formato geral circular e disposto vertical, paralelo e simetricamente centrado na parte inferior da câmara de mistura (2) como agitador da câmara de mistura (2) e uma placa térmica (2E) de formato geral circular e disposta horizontal, paralela e simetricamente centrada na parte inferior da câmara de mistura (2); e a câmara de cultivo e monitoramento (3) é constituída por uma entrada lateral (3A) de formato geral cilíndrica e disposta horizontal, perpendicular e simetricamente centrada na lateral esquerda da câmara de cultivo e monitoramento (3) como entrada do meio circulante desta, uma saída superior (3B) de formato geral cilíndrica e disposta vertical, perpendicular e simetricamente centrada na extremidade direita da câmara de cultivo e monitoramento (3) como saída do meio circulante desta, um conjunto de parafusos laterais com borboletas (3C) de formato gerais cilíndricos e dispostos verticais, paralelos e simetricamente transpassantes e espaçados ao longo das extremidades da câmara de cultivo e monitoramento (3), um conjunto de acessos (3D) de formatos

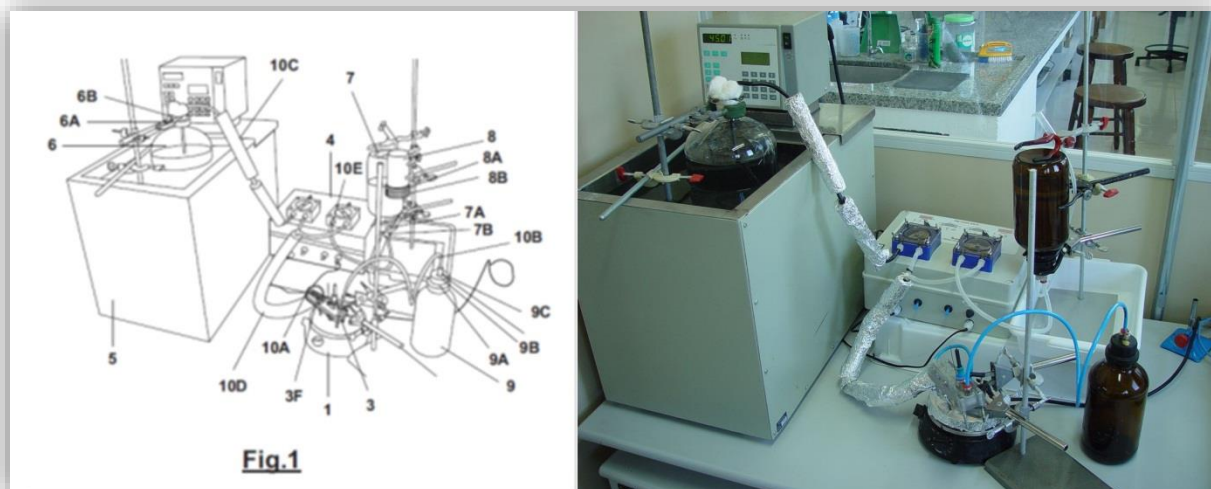


gerais cilíndricas e dispostas verticais, paralelas e simetricamente espaçadas entre si sobre e ao longo da parte esquerda da câmara de cultivo e monitoramento (3) como receptáculos dos corpos-de-prova (3E), um conjunto de corpos-de-prova (3E) de formatos gerais cilíndricos em epóxi ou similar e cada qual disposto vertical e simetricamente encaixado sob pressão em um acesso (3D) garantindo a vedação do sistema na área de adesão e tendo um anel de vedação de borracha - O'Ring (3F) disposto simetricamente ao redor da extremidade superior do corpo-de-prova (3E) como avaliações microscópicas e espectroscopia por infravermelho, um eletrodo referência de fio de prata (Ag) (3G) de formato geral cilíndrico e disposto vertical e simetricamente adjacente a saída superior (3B) como avaliação eletroquímica, um eletrodo trabalho com superfície alvo (3H) de formato geral cilíndrico e disposto vertical e simetricamente entre o eletrodo referência de fio de prata (Ag) (3G) e a saída superior (3B) como avaliação eletroquímica e um eletrodo contra trabalho de platina (Pt) (3I) de formato geral similar a um "L" e disposto vertical, perpendicular e simetricamente na face lateral da câmara de cultivo e monitoramento (3) adjacente a saída superior (3B) como avaliação eletroquímica.

### 5.3 RESUMO

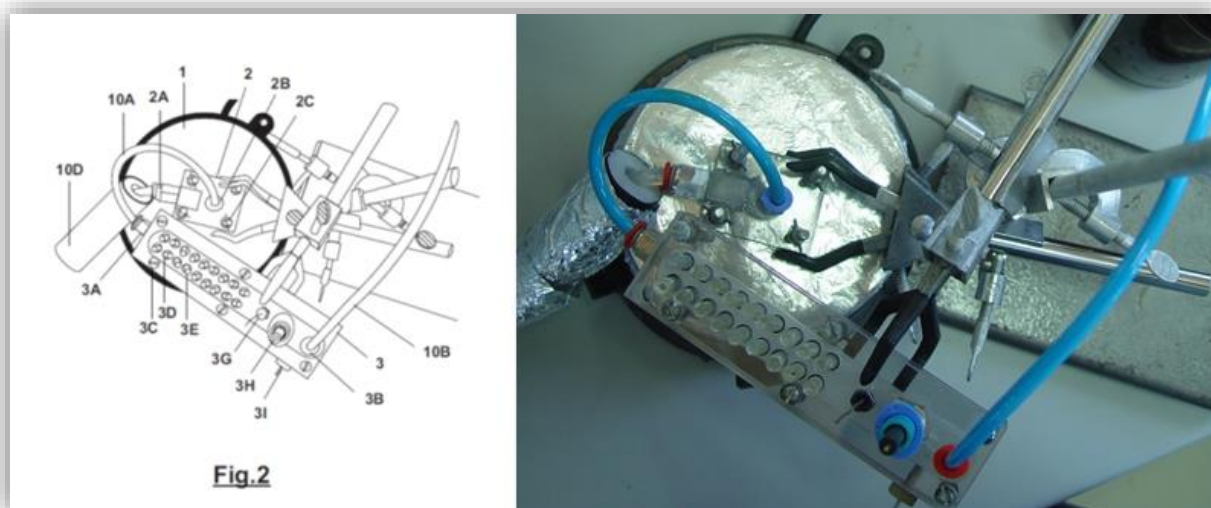
"SISTEMA EM FLUXO CONTÍNUO PARA MONITORAMENTO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM SUBSTRATO SÓLIDO POR TÉCNICAS MICROSCÓPICAS E ELETROQUÍMICAS", descreve-se como um sistema em fluxo contínuo para monitoramento da formação de biofilme em substrato sólido por técnicas microscópicas e eletroquímicas que, de acordo com as suas características, propicia a formação de um sistema em fluxo contínuo de monitoramento que permite análises microscópicas e espectroscopia por infravermelho dos micro-organismos aderidos à superfície alvo e análises eletroquímicas das alterações na interfase substrato sólido/líquido circulante - biofilme sobre substrato sólido, com vistas a possibilitar de forma extremamente prática, segura e precisa uma completa otimização na avaliação do padrão de adesão e evolução do biofilme utilizam-se técnicas microscópicas e espectroscopia por infravermelho e eletroquímicas que permitem identificar os parâmetros importantes no processo de colonização e maturação do biofilme sobre os substratos sólidos.

## 5.4 Figuras e imagens do sistema descrito



**Figura 29 - Visão geral do sistema de cultivo monitorado para formação de biofilme**

Fonte: (MARANGONI *et al.*, 2013d)



**Figura 30 - Câmara de cultivo, câmara de mistura e sistema de agitação e aquecimento**

Fonte: (MARANGONI *et al.*, 2013d)



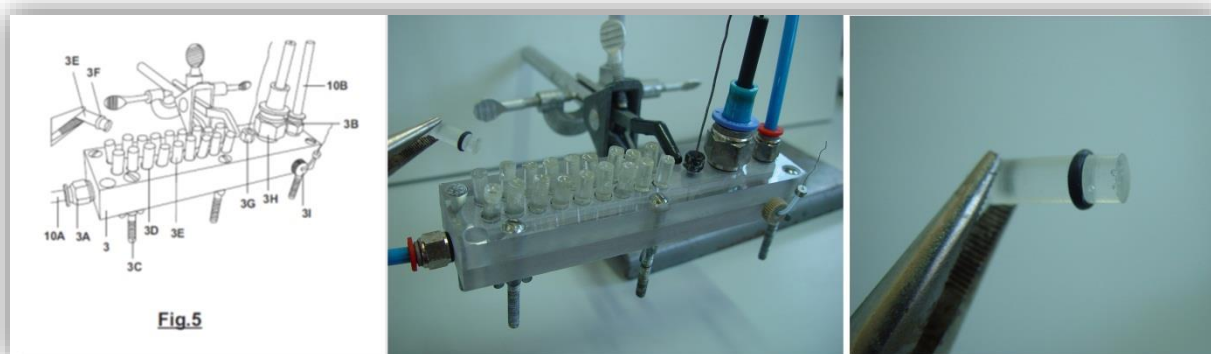
**Figura 31 - Câmara de mistura e sistema de agitação e aquecimento**

Fonte: (MARANGONI *et al.*, 2013d)



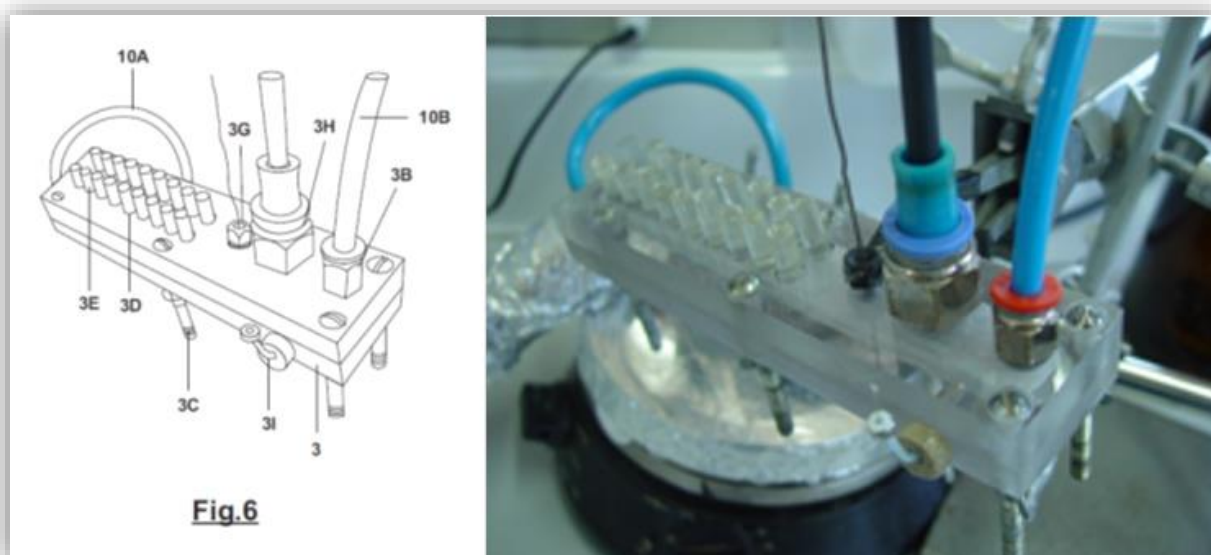
**Figura 32 - Detalhe da câmara de mistura, visão inferior e superior**

Fonte: (MARANGONI *et al.*, 2013d)



**Figura 33 - Câmara de cultivo, destaque para área de eletrodos para análise da adesão de biofilmes**

Fonte: (MARANGONI *et al.*, 2013d)



**Figura 34 - Câmara de cultivo, destaque para área de eletrodos para análise eletroquímica**

Fonte: (MARANGONI *et al.*, 2013d)

## 5.5 CULTIVO EM BIORREATORES

Os processos de fermentação em biorreatores possuem três tipos principais de operação: descontínuo, descontínuo alimentado e contínuo. A correta seleção do sistema de operação definirá o sucesso na taxa conversão de substrato, formação de

produto, a possibilidade de contaminação e a confiabilidade do processo (DORAN, 1995).

- Descontínuo: operam em sistemas fechados de maneira que os nutrientes e inóculos são adicionados no começo do processo e os produtos são retirados somente ao final, também conhecidos como fermentação em batelada.
- Descontínuo alimentado: a alimentação de nutrientes se realiza de maneira intermitente, ou contínua, a fim de controlar a concentração de substrato existente no biorreator. Esta estratégia de operação é utilizada quando elevadas concentrações de substrato ou metabólitos residuais podem inibir a reação e/ou produzir uma via metabólica não desejada.
- Cultivo contínuo: também é conhecido como CSTR (*continuous stirred-tank reactor*), caracteriza-se por possuir uma alimentação contínua de meio de cultura fresco a uma vazão determinada e constante e retirada de produtos ou meio de cultivo fermentado na mesma vazão da alimentação, esta estratégia mantém o volume no biorreator constante.

### 5.5.1 Cultivo Contínuo

Um dos principais recursos que diferencia sistemas de cultivo contínuos dos sistemas descontínuos é a habilidade do crescimento celular ocorrer balanceado entre a entrada de meio estéril e a retirada de meio decultivo consumido, células vivas e *debris*. Com a manutenção de volume constante, o sistema pode atingir a condição de estado estacionário ou regime permanente, condição na qual as variáveis de estado (concentração de células, de substrato limitante e de produto) permanecem constantes ao longo do tempo de operação do sistema (FACCIOTTI 2001). Exemplos de reatores de cultivo contínuo para formação de biofilmes são: *CDC biofilm Reactor* (ASTM, 2012c; ASTM, 2012a), *Drip Flow biofilm Reactor* (ASTM, 2012b), *Rotating Disk Reactor* (ASTM, 2012d), Sistema de cultivo em regime turbulento (PERNI *et al.*, 2006). Já na cultura descontínua alimentada tem-se o exemplo do reator com câmara de cultivo e câmara de formação de biofilme (NIGAUD *et al.*, 2010).

A manutenção das células em um mesmo estado fisiológico torna o processo contínuo uma excelente ferramenta para estudos de mecanismos de regulação metabólica ou influencia de micro-organismos sobre determinados sistemas. Isto porque é possível observar a atividade do micro-organismo em diferentes ambientes, modificando a concentração e vazão específica de alimentação, adição de novos compostos ou nutrientes (NIGAUD *et al.*, 2010; COENYE, NELIS, 2010; BEN-YOAV *et al.*, 2011; PERNI *et al.*, 2006; ASTM, 2011; ASTM, 2012e; ASTM, 2012a).

### 5.5.1.1 Equacionamento para Cultivo Contínuo

Para efeitos de cálculo e equacionamento do biorreator contínuo sem reciclo de células, e considerando agitação perfeita e volume constante, pode-se escrever o seguinte balanço material para o micro-organismo:

$$(Variação da massa de células no biorreator) = (Massa de células que entra) - (Massa de células que sai) + (Massa de células que cresce) \quad \text{Eq. 1}$$

Considerando o volume constante, tem-se:

$$V \cdot \frac{dX}{dt} = F \cdot X_a - F \cdot X + V \cdot \left( \frac{dX}{dt} \right)_{crescimento} \quad \text{Eq. 2}$$

Sendo:

$F$  = vazão volumétrica de alimentação de meio (L/h)

$V$  = volume de meio no reator (L)

$X$  = concentração de células no biorreator (g/L)

$X_a$  = concentração de células no meio de alimentação (g/L)

A velocidade instantânea de crescimento pode ser expressa como:

$$\left( \frac{dX}{dt} \right)_{crescimento} = \mu \cdot X \quad \text{Eq. 3}$$

Onde:

$\mu$  = velocidade específica de crescimento ( $h^{-1}$ )

Define-se vazão específica de alimentação (D), como sendo a relação entre a vazão volumétrica de alimentação e o volume de meio no biorreator. Assim, tem-se que:

$$D = \frac{F}{V} \text{ (h}^{-1}\text{)} \quad \text{Eq. 4}$$

Sendo que  $1/D$  é tempo de residência hidráulica no biorreator ( $t_r$ ). Deste modo, substituindo a  $t_r$  e  $X_a$  na equação 4 e assumindo que o meio de alimentação é estéril ( $X_a = 0$ ), obtém-se:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - D \cdot X \quad \text{Eq. 5}$$

Considerando que se tenha atingido a situação de estado estacionário no biorreator, no qual a concentração celular permanece constante ( $dX/dt = 0$ ), obtém-se:

$$\mu \cdot X = D \cdot X \quad \text{ou} \quad \mu = D \quad \text{Eq. 6}$$

Portanto, na condição de estado estacionário a concentração celular se mantém constante devido a um equilíbrio entre a velocidade de crescimento celular e a velocidade de retirada de células do Biorreator e, ainda, ao fato de que a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) é igual à vazão específica de alimentação (D).

Considerando a mesma situação de estado estacionário para substrato limitante S para equacionar os balanços materiais, se obtém a expressão a seguir:

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot (S_a - S) - \mu_s \cdot X \rightarrow D \cdot (S_a - S) = \mu_s \cdot X \therefore \mu_s = \frac{D}{Y_{X/S}} \quad \text{Eq. 7}$$

Onde:

S = concentração de substrato limitante no biorreator (g/L)

$S_a$  = concentração de substrato limitante no meio de alimentação (g/L)

$\mu_s$  = velocidade específica de consumo de substrato ( $g_{\text{substrato}} \cdot g_{\text{célula}}^{-1} \cdot h^{-1}$ )

$Y_{x/s}$  = fator de conversão de substrato limitante S a células ( $g_{célula}/g_{substrato}$ )

Em uma grande faixa dos valores de  $D$ , os valores de  $X$  permanecem praticamente constantes, ocorrendo uma brusca queda até o valor zero, quando  $D$  se aproxima do valor de  $\mu_{max}$ . Neste ponto o valor de  $S$  tende ao infinito, o que na prática significa tender ao maior valor possível, ou seja, a concentração de substrato na alimentação. Quando  $S = S_a$ , obtém-se um valor nulo para a concentração celular em estado estacionário. Tal condição de operação é conhecida como “estado transiente de lavagem” (*washout*), situação na qual ocorre um arraste das células do biorreator. Nesse ponto, o valor da vazão específica de crescimento é denominado “ $D$  crítico” ( $D_c$ ) (FACCIOTTI, 2001).

A lavagem do biorreator é usualmente empregada para a determinação da velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ), sendo esta técnica conhecida como método dinâmico de determinação de  $\mu_{max}$ . Esta técnica consiste em, partindo-se de um estado estacionário ( $\mu = D$ ), impõem-se uma vazão específica de alimentação nitidamente superior a  $\mu_{max}$ , de forma a se obter um decréscimo da concentração celular no reator. Assim, integrando-se a  $\frac{dX}{X} = (\mu_{max} - D) dt$  entre  $t_0$  e  $t$ , o instante em que se fez  $D > \mu_{max}$ , no qual se tinha uma concentração celular igual a  $X_i$ , tem-se:

$$\ln\left(\frac{X}{X_i}\right) = (\mu_{max} - D) \cdot (t - t_0) \quad \text{Eq. 8}$$

Plotando-se  $\ln(X/X_i)$  em função do tempo, obtém-se uma reta, cujo coeficiente angular é igual a  $\mu_{max} - D$ . Como  $D$  é conhecido, calcula-se assim o valor de  $\mu_{max}$ .



## **CAPÍTULO 6 - AVALIAÇÃO ELETROQUÍMICA DA ADESÃO DE BACTÉRIAS SOBRE SUPERFÍCIE METÁLICA**

Serão apresentadas as metodologias e resultados relacionados ao monitoramento da adesão de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 em superfície metálica, utilizando técnicas de cultivo microbiológico e ferramentas eletroquímicas de análise das alterações da superfície.

A corrosão induzida por micro-organismos está sempre associada a biofilmes, os quais se desenvolvem progressivamente sobre superfícies metálicas. Os biofilmes são compostos de metabólito polimérico extracelular – MPE – (lipídios, polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.) e um consórcio de micro-organismos tais como bactérias, algas e fungos. As características na interface metal/biofilme são alteradas pelo metabolismo dos micro-organismos presentes no biofilme. Um exemplo de metabolismo é a produção de MPE secretados por estes micro-organismos (COETSER, CLOETE, 2005) e modificações no nível de secreção de fatores responsáveis pela comunicação entre células individuais, através da liberação de uma molécula de sinalização a partir da bactéria para coordenar seus esforços gerando um comportamento multicelular, conhecido na literatura microbiológica como *quorum sensing* – QS (WILLIAMS, CÁMARA, 2009). Bactérias do gênero *Pseudomonas* sp estão entre os micro-organismos mais comumente envolvidos com a formação de biofilmes e *quorum sensing*, especificamente a *Pseudomonas aeruginosa* (KIEVIT, IGLEWSKI, 2000).

Sobre um metal em contato com água, podem ocorrer processos biológicos e processos inorgânicos, cujo resultado é a corrosão. Ambos os fenômenos modificam de forma intensa o comportamento da interface metal/solução. Os processos biológicos (bioincrustação) e os processos inorgânicos (corrosão) ocorrem de forma simultânea, mas seguem direções opostas. A bioincrustação é um processo de acumulação de micro-organismos, algas, etc., que se dirige do seio do líquido para a superfície metálica, já a corrosão transcorre no sentido oposto, da superfície metálica (que se dissolve) para o seio do fluido. Como consequência de ambos os processos,

forma-se uma nova interface metal/solução, onde ocorre o desenvolvimento da corrosão microbiológica (VIDELA, 2003). A presença de micro-organismos e seus metabólitos (MPE) pode desencadear vários processos, dentre os quais, a corrosão influenciada por micro-organismos (CIM), entupimentos e incrustações (MITTELMAN 1998; VIEIRA *et al.*, 1993). Os estudos dos mecanismos envolvidos neste processo fornecem suporte para que estratégias mais efetivas possam ser traçadas e efetivamente atingir estes micro-organismos (MAPELLI *et al.*, 2008) podendo, assim, estabelecer um controle eficaz e evitar os problemas decorrentes da formação de biofilmes.

## **6.1 Etapa 1 – cultivo estacionário**

### **6.1.1 Metodologia**

#### **6.1.1.1 Micro-organismo e meio de cultivo.**

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foram cultivadas em caldo de soja (TSB-*Tryptic Soy Broth*, Himedia, HiMedia Laboratories, Índia) a 37 °C por 18 h. Para os experimentos de adesão bacteriana e desenvolvimento de biofilme, as células foram colhidas por centrifugação e lavadas duas vezes com sais mínimos M9 (STOODLEY *et al.*, 1997). Para os experimentos de adesão bacteriana o meio M9 foi suplementado com 2,0 g de glicose e 0,4940 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . A densidade celular do inóculo foi ajustada para aproximadamente  $10^8$  UFC / mL utilizando espectrofotômetro UV/visível (Shimadzu Corp.) em que uma densidade óptica na faixa entre 0,1 nm a 600 nm indicou  $10^8$  UFC / mL.

#### **6.1.1.2 Preparação do eletrodo de trabalho**

Eletrodos de platina (Bioanalytical Systems Inc.) com 1,6 mm de diâmetro foram utilizados para as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica e, lâminas de platina (1,0 mm x 1,0 mm x 0,1 mm) embutidas em resina epóxi foram preparadas para as análises das imagens superficiais realizadas em banco metalográfico (Leica, modelo MM6). As lâminas foram polidas com pasta de diamante e de alumina. Os eletrodos permaneceram por 15 min em etanol a 70 % seguido de irradiação com luz ultravioleta (254 nm) por 15 min para o processo de esterilização.

### **6.1.1.3 Adesão de bactérias e formação de biofilme**

Uma célula eletroquímica tradicional foi utilizada como reator. Para medidas de EIS o eletrodo de trabalho (platina), o contra eletrodo (platina) e o eletrodo de referência (Ag/AgCl, saturado em KCl) foram inseridos por orifícios da tampa superior do reator. Para a adesão inicial de células bacterianas na superfície da platina, o reator foi preenchido com o sal mínimo M9 suplementado com glicose e  $\text{MgSO}_4$  e o sistema foi inoculado no tempo 0 h com 1,0 mL do inóculo ajustado ( $10^8$  UFC / mL) e, dessa forma, iniciou-se a fermentação com uma concentração de  $10^6$  UFC / mL em 100 mL de meio M9. Durante o experimento o sistema foi mantido em temperatura de 37 °C. As análises das imagens das superfícies das amostras óticas foram conduzidas no mesmo período de tempo das medidas de EIS realizadas, isto é, para cada imagem ótica há um espectro de impedância eletroquímica associado. Adicionalmente, um experimento similar de controle sem a presença de bactéria foi realizado utilizando o meio de sal mínimo M9 suplementado com glucose e  $\text{MgSO}_4$  e incubado a 37 °C de temperatura, estes dados não foram tratados neste trabalho mas foram levados em consideração para controle das condições de cultivo.

### **6.1.1.4 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)**

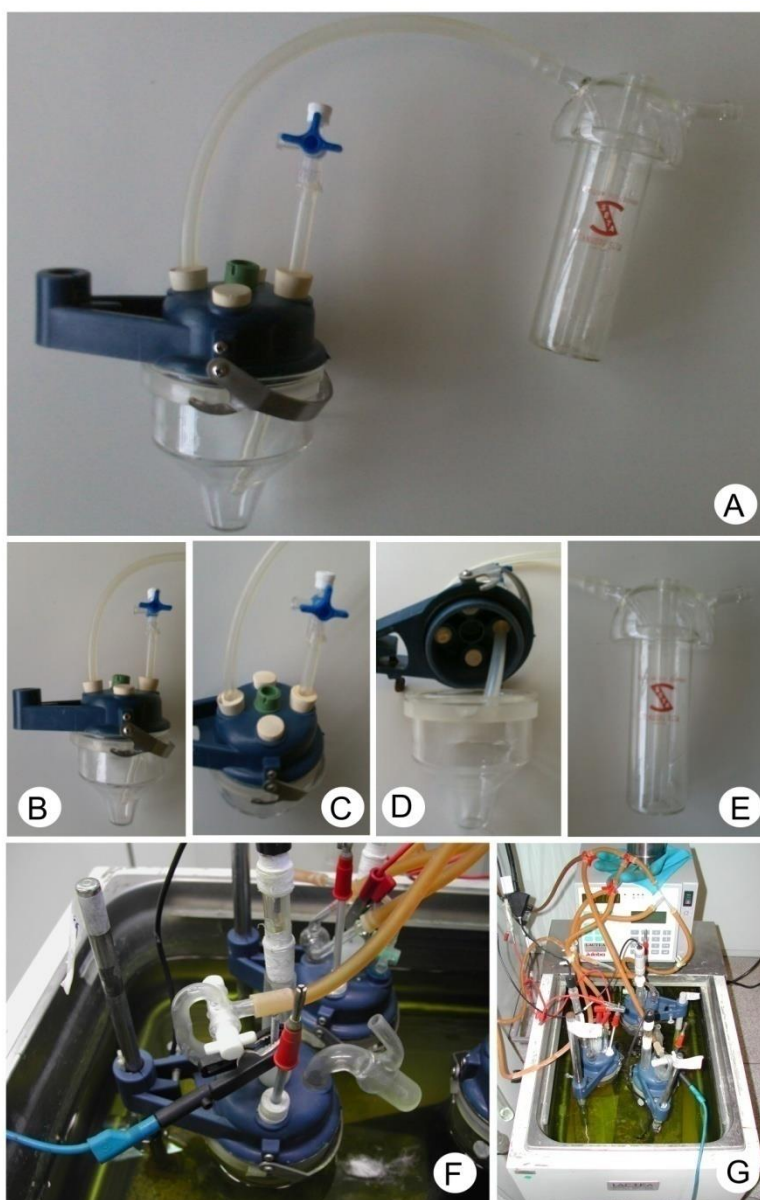
Os experimentos foram realizados utilizando um potenciostato/galvanostato modelo PARSTAT 2273 (Princeton Applied Research) com módulo de impedância e um software PowerSuite®. As medidas foram realizadas na faixa de frequência entre 100 kHz a 100 mHz com amplitude do sinal de 10 mV. Para todas as medidas foi aplicado um potencial DC de 0,0 V em relação ao potencial de circuito aberto, para minimizar o efeito da polarização sobre o processo de adesão das bactérias sobre a superfície da platina. Esse procedimento foi adotado uma vez que uma polarização anódica pode causar uma contração no biofilme enquanto que uma polarização catódica pode causar uma menor expansão do biofilme (MAPELLI *et al.*, 2008). As medidas de EIE foram conduzidas em tempos de cultivo predeterminados entre 15 min e 24 h, em temperatura de 37 °C. O tempo 0 h representa a condição sem bactéria, isto é, apenas o meio de cultivo M9 com seus suplementos. O meio de cultivo foi inoculado utilizando uma seringa estéril através da linha de alimentação da célula eletroquímica. Para efeitos de comparação dos diagramas de impedância, foram

realizados experimentos nos mesmos intervalos de tempo sem a adição do inóculo, para verificar a influência do crescimento microbiano sobre a superfície da platina. O ajuste dos dados de impedância foi realizado pela análise de circuito equivalente utilizando o software Zview® (Scribner Associates Inc.)

#### **6.1.1.5 Monitoramento do biofilme – descrição do sistema estacionário utilizado**

Na Figura 35 são apresentados os componentes para o cultivo dos micro-organismos e adesão microbiológica em eletrodos metálicos para avaliação por espectroscopia por impedância. A Figura 35 (A) mostra uma visão geral do sistema montado sem os eletrodos (metálico, contra-prova e referência). Já na Figura 35 (B, C e D) pode-se visualizar com detalhamento os acessos sobre a câmara e na Figura 35 (E) a visualização do sistema de liberação dos gases formados (consequência do metabolismo bacteriano), que impede a entrada de ar na câmara e contaminações.

Ainda na Figura 35 (F e G) pode-se observar o sistema em funcionamento.



**Figura 35 – Sistema para cultivo estacionário de micro-organismo e teste da influência da formação de biofilme sobre metais**

Nota: Adaptação de célula eletroquímica para cultivo microbiológico em batelada (A), Acesso para injeção de inóculo e nutriente no fundo para homogeneizar o material quando inserido (B), Acessos superiores para inserção do eletrodo trabalho de platina, eletrodo auxiliar de platina e referência de Ag/AgCl (C), Visualização interna da célula, saída de gases do sistema (D), “Trap” para saída dos gases do sistema e bloqueio de entrada de ar externo para evitar contaminação do sistema durante cultivo (E), sistema em funcionamento, que permanece em banho ultratermostático com

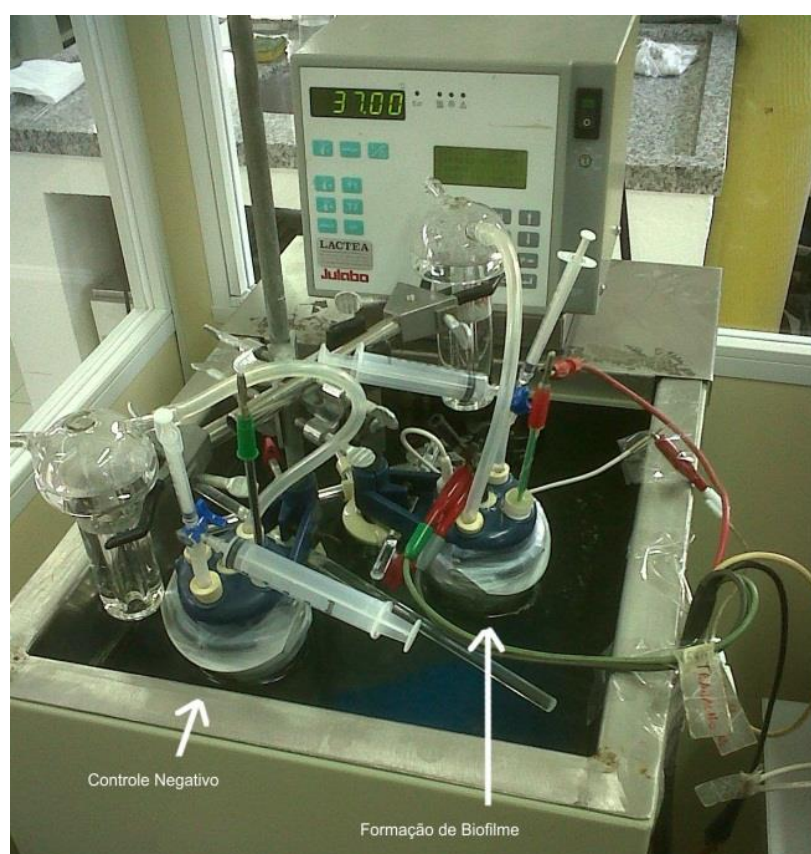
recirculação e mantido à 37 °C (F), Sistema completo em funcionamento com experimentos teste e controle (G).

Fonte: O Autor

### **6.1.2 Resultados**

Na Figura 36 está apresentada uma fotografia do arranjo experimental utilizado para o monitoramento do desenvolvimento do biofilme por espectroscopia de impedância eletroquímica, em solução estagnada. Uma célula sem o inóculo foi utilizada como forma de controle para comparação dos dados com e sem a presença de bactéria. O monitoramento ótico da adesão das bactérias e desenvolvimento do biofilme foi realizado em reator montado em separado, com as amostras sendo retiradas para análise nos mesmos tempos das medidas de EIE.

As medidas de EIE foram desenvolvidas varrendo uma faixa de frequência de 100 kHz a 100 mHz para identificar e caracterizar as propriedades elétricas da interface platina/meio de cultivo com inóculo durante a adesão e desenvolvimento do biofilme. As medidas foram realizadas aplicando um potencial DC de 0,0 V em relação ao potencial e circuito aberto para minimizar os efeitos da polarização sobre o processo de adesão.

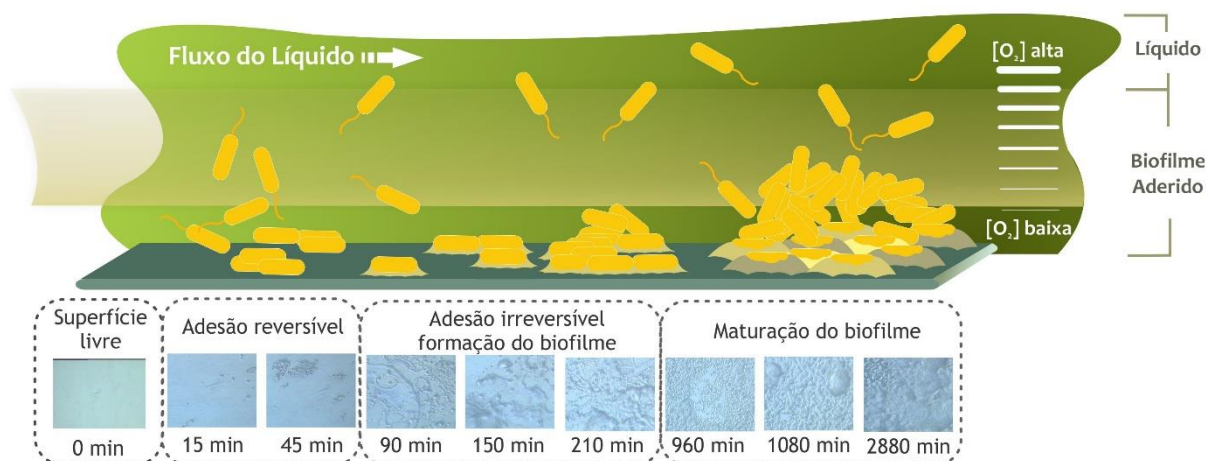


**Figura 36 - Fotografia do arranjo experimental utilizado para o estudo da adesão e desenvolvimento de biofilme sobre superfície de platina. As duas células de medidas, sem inóculo e com inóculo, foram mantidas a 37° C.**

Fonte: (MARANGONI *et al.*, 2013c)

Na Figura 37 está apresentado um diagrama esquemático ilustrando as diferentes etapas de formação de biofilme. Uma das teorias descrita na literatura que explica a formação de biofilmes ressalta que a adesão é um processo que ocorre em duas etapas (MARSHALL *et al.*, 1971). Na primeira etapa, o processo é ainda reversível, em função do processo de adesão do micro-organismo na superfície ocorrer por meio de forças de Van der Waals e atração eletrostática (MULVEY, HULTGREN, 2004). Na segunda etapa, a teoria considera que ocorre a interação física da célula com a superfície através de material polimérico extracelular de natureza polissacarídica ou protéica, produzido pela bactéria, denominado glicocálix, que suporta a formação de biofilmes. O glicocálix seria o responsável por favorecer o processo de adesão superficial e fornecer condições de adesão do peptidoglicano

das bactérias Gram-positivas e a parte externa, membrana externa, das Gram-negativas (PARIZZI, 1998).

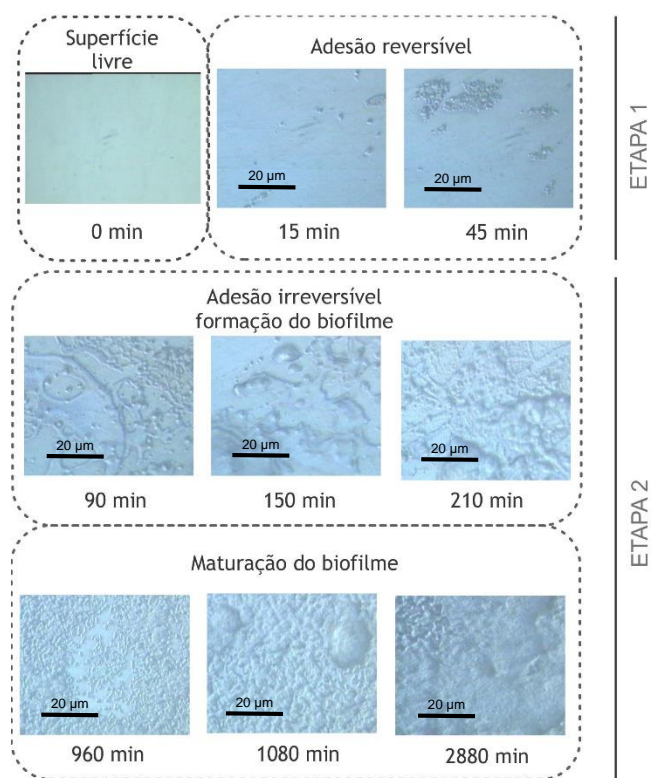


**Figura 37 - Diagrama esquemático das etapas de adesão bacteriana e formação de biofilme em superfícies sólidas em meio aquoso**

Fonte: (MARANGONI *et al.*, 2013c)

Imagens da superfície de um eletrodo de platina revelando os estágios de adesão e desenvolvimento do biofilmes foram realizadas utilizando microscopia ótica e estão apresentadas na Figura 38, onde observa-se a variação do grau de recobrimento da superfície metálica em função do tempo. No tempo 0 min, situação em que não há bactérias no meio de cultivo, a superfície não apresenta nenhum sinal de adesão bacteriana.



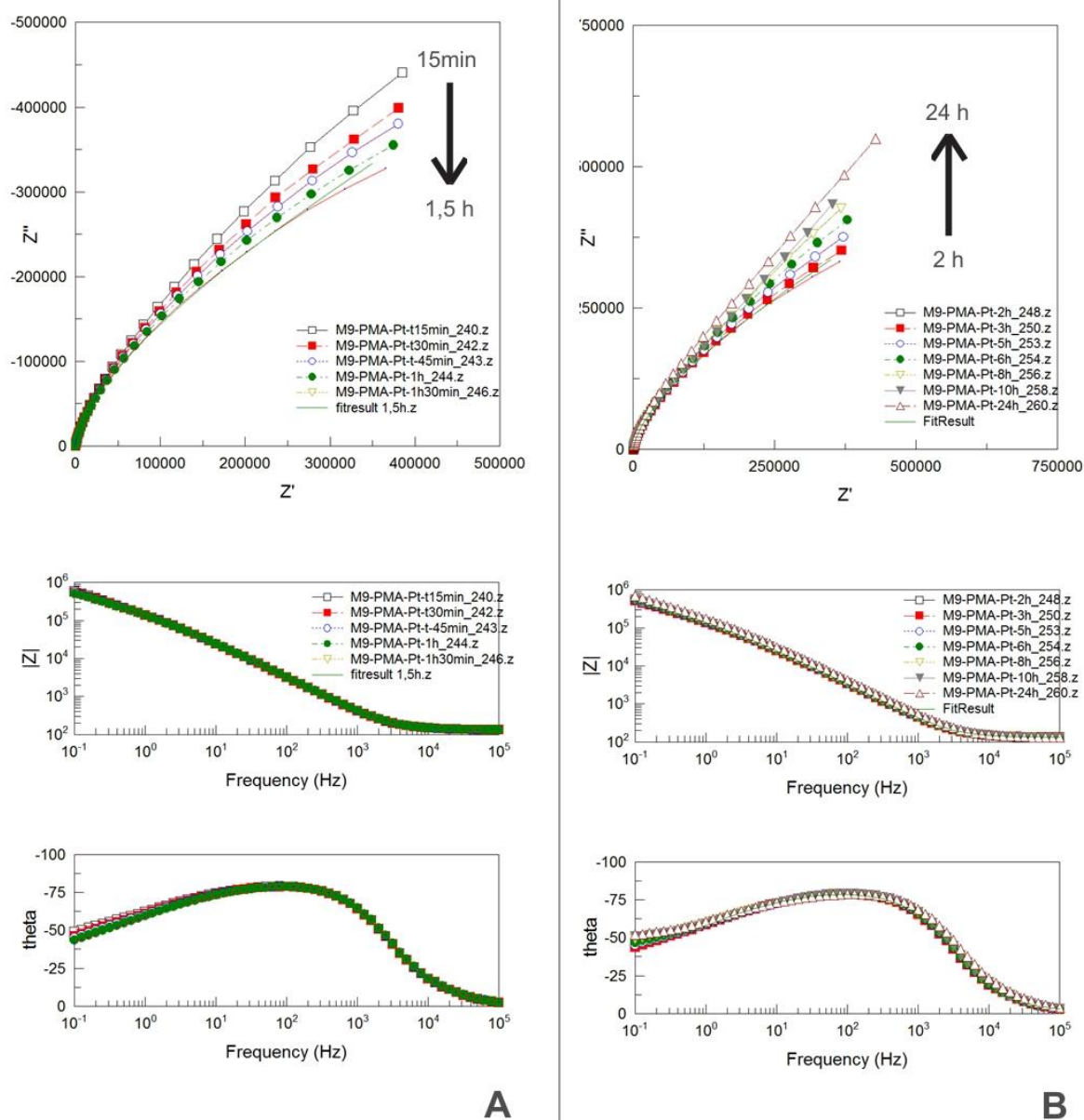


**Figura 38 - Imagens de microscopia ótica indicando os estágios da formação do biofilme da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* sobre eletrodo de platina.**

Fonte: (MARANGONI *et al.*, 2013c)

Levando-se em conta o diagrama esquemático da Figura 37 pode-se descrever o processo de adesão, formação e maturação do biofilme sobre a platina. Assim, na Figura 38 observa-se a etapa 1 representada pelo processo de adesão (iniciação), baixo grau de recobrimento e, a etapa 2, representada pela formação e maturação do biofilme, maior grau de recobrimento.

Na Figura 39 estão apresentados os diagramas de Nyquist para diferentes períodos de deposição da *Pseudomonas aeruginosa* sobre superfície de platina. Os resultados demonstram a variação dos valores medidos principalmente para a região de frequências menores do que 1 Hz. Essa variação é esperada devido ao efeito das mudanças de massa do biomaterial em termos de células bacterianas totais depositadas sobre o eletrodo. Na Figura 39A os espectros correspondem ao tempo desde 15 min até 90 min. Na Figura 39B os espectros correspondem a período de tempo entre 2 h e 24 h.



**Figura 39 – Diagramas de Nyquist obtidos em diferentes tempos do contato do eletrodo de platina em meio de cultivo M9 inoculado com bactéria *Pseudomona aeruginosa***

Nota: Monitoramento da formação de biofilme tempo de 0 h a 1,5 h (A), monitoramento da formação de biofilme tempo de 1,5 h a 24 h (B)

Fonte: (MARANGONI *et al.*, 2013c)

Pelo fato das medidas terem sido realizadas em solução estagnada, considerou-se que as medidas de impedância tenham sido afetadas pela difusão das espécies devido à interação eletrostática e química com as vizinhanças do biomaterial.

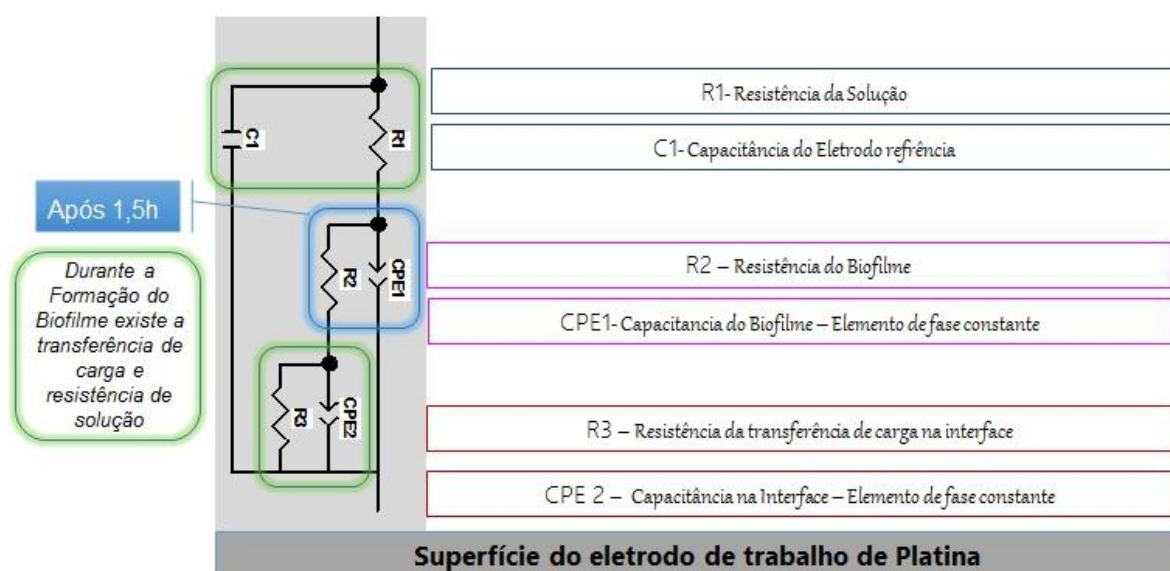
Entretanto, o efeito da etapa de crescimento do biofilme sobre a resposta de impedância pode ser devido às mudanças na estrutura do biofilme, isto é, tanto a difusividade quanto a porosidade podem mudar com os estágios de crescimento do biofilme.

Foi utilizado um modelo de circuito equivalente para descrever as interações entre o biomaterial e a superfície da platina. O modelo de circuito equivalente proposto é apresentado na Figura 40 e foi utilizado para caracterizar o desenvolvimento de biofilme da *Pseudomonas aeruginosa* sobre uma superfície de platina. A Figura 41 apresenta as curvas de ajuste obtidas para obtenção do modelo de circuito equivalente da Figura 40. Vários modelos baseados em circuitos equivalentes têm sido utilizados para caracterizar as interfaces eletrodo/eletrólito e eletrodo/bactéria/eletrólito para interpretar os dados de espectroscopia de impedância eletroquímica (GARCÍA-ALJARO *et al.*, 2009; GONÇALVES, GOVIND, 2009; YANG *et al.*, 2004; BAYOUDH, *et al.*, 2008). O desenvolvimento do biofilme foi considerado em três estágios (COSTERTON *et al.*, 1999): iniciação, crescimento e maturação (Figura 37 e Figura 38).

O estágio inicial sendo caracterizado pela adesão reversível de células bacterianas no substrato. No segundo e terceiro estágios, de crescimento e maturação do biofilme, respectivamente, caracterizados pela proliferação das células bacterianas e produção de uma matriz de exopolissacarídeo (EPS), responsável pela manutenção da estrutura do biofilme.

O mesmo modelo de circuito equivalente foi utilizado para descrever o desenvolvimento do biofilme, o qual inclui os três estágios do desenvolvimento. No estágio inicial, o biomaterial é composto basicamente de células individuais distribuídas ao longo da superfície do eletrodo de trabalho, enquanto que no estágio de crescimento e maturação o biomaterial é composto de uma estrutura com poros interconectados entre eles. O modelo utilizado para descrever a interface eletrodo/biomaterial inclui um elemento R1 representando a resistência da solução, C1 a capacitância associada ao eletrodo de referência, CPE1 o elemento de fase constante relacionado à capacitância do biofilme, R2 a resistência do biofilme, CPE2

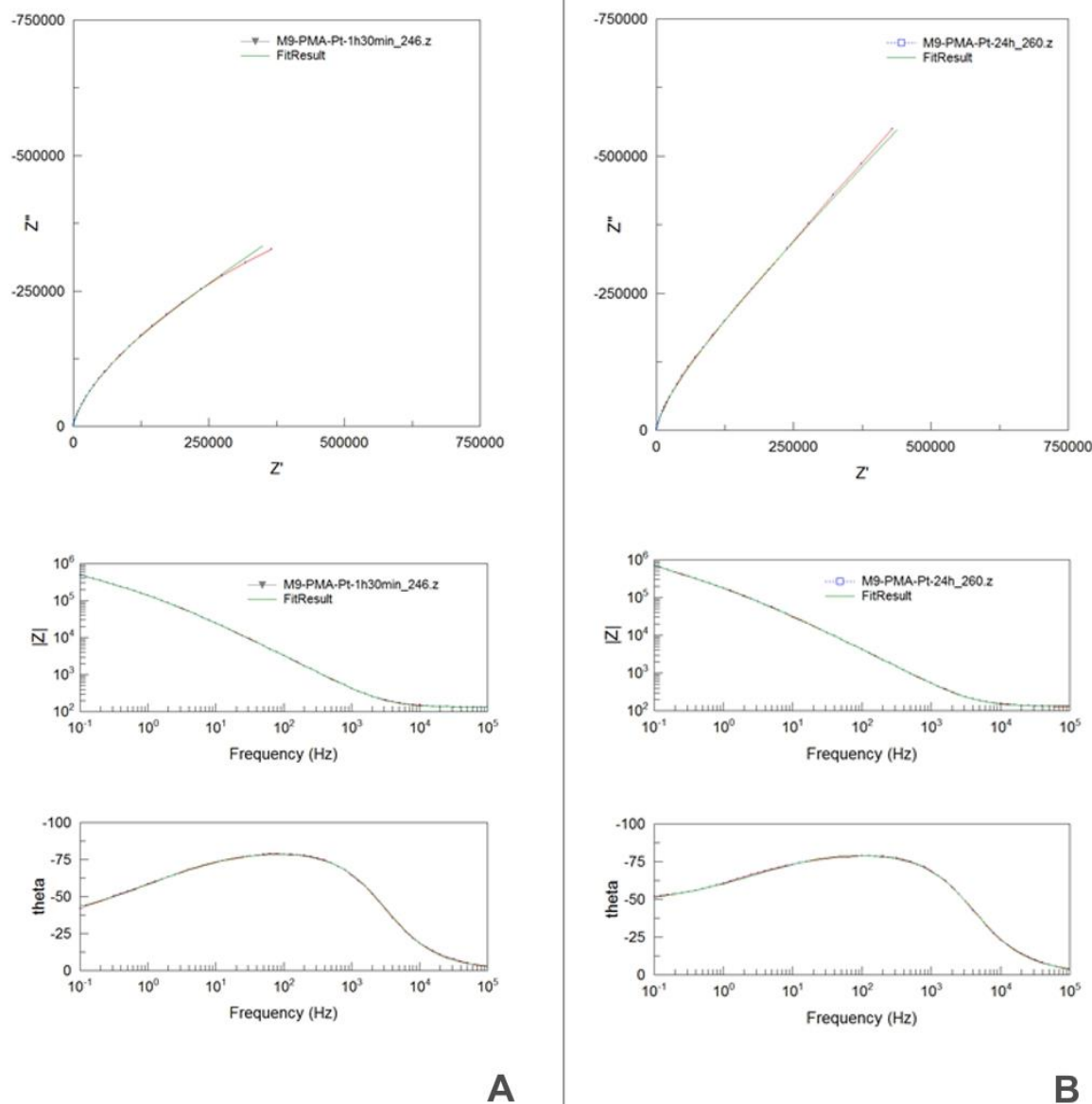
o elemento de fase constante da interface e R3 a resistência de transferência de carga na interface, esta representação pode ser melhor visualizada na Figura 40.



**Figura 40 - Circuito equivalente descrevendo as interações eletroquímicas entre o biomaterial e a superfície condutora de platina**

Fonte: (MARANGONI *et al.*, 2013c)

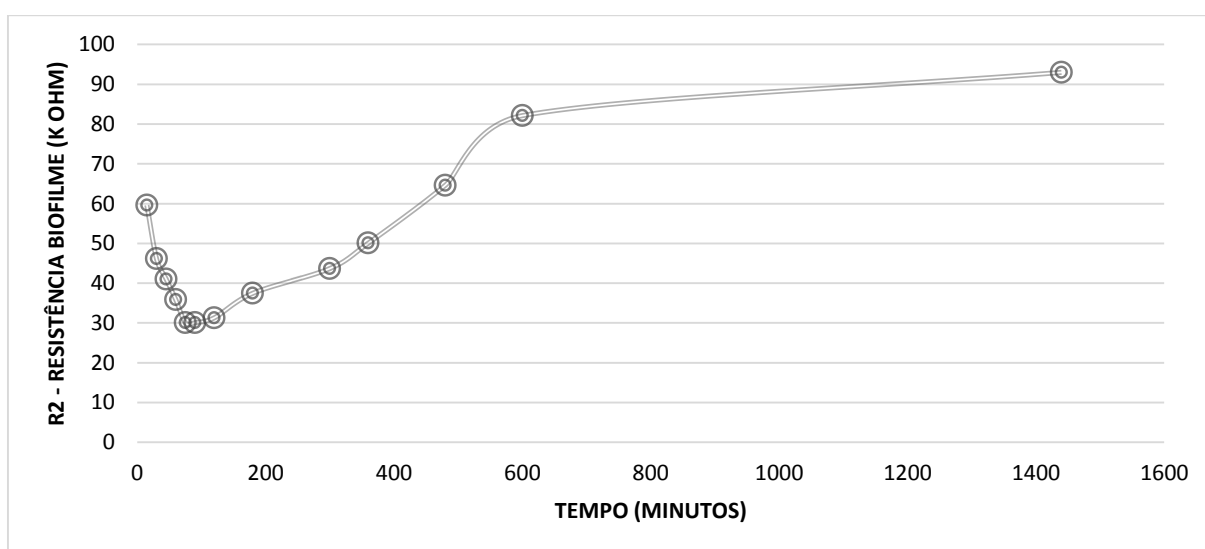
Nota: R1 representa a resistência da solução, C1 a capacitância associada ao eletrodo de referência, CPE1 o elemento de fase constante relacionado a capacitância do biofilme, R2 a resistência do biofilme, CPE2 o elemento de fase constante da interface e R3 a resistência de transferência de carga na interface.



**Figura 41 - Curva de ajuste das medidas experimentais tempos de 1,5 h (A) e 24h (B)**

O resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica da interação da *Pseudomonas aeruginosa* sobre a platina foram ajustados utilizando o software ZView® e o modelo da Figura 40. Os valores da resistência do biomaterial em função do período de deposição da *Pseudomonas aeruginosa* sobre platina, extraídos do modelo de circuito equivalente, estão apresentados na Figura 42. Pode-se observar que ocorre uma diminuição da resistência R2 com o aumento do período de deposição até o período de 1,5 h. Isso pode ser atribuído ao aumento da quantidade de biomaterial depositado sobre a platina, resultado de uma maior concentração de

células de bactérias aderidas. Para tempos de deposição de biomaterial maiores do que 1,5 h, os estágios de crescimento e maturação do biofilme ocorrem com a proliferação de células bacterianas e a produção de matriz de exopolissacarídeo. Tempos maiores do que 1,5 h representa um biofilme já formado sobre a superfície da platina que está na fase de maturação em função do tempo, em acordo com os dados da etapa 2 apresentados na Figura 38. Os valores dos dados de R2 extraídos para tempos maiores do que 1,5 h resultaram num aumento na resistência e numa diminuição da capacitância do biomaterial em função do tempo. A Tabela 2 apresenta os valores e erros obtidos no ajuste do modelo de circuito equivalente apresentado na Figura 40. Esse resultado pode ser atribuído ao aumento da espessura do biofilme. Observa-se também, que a partir de um determinado tempo, atinge-se uma situação característica de estado estacionário onde a espessura e as propriedades do biofilme não variam significativamente, tempos maiores do que 10 h.



**Figura 42 - Perfil da variação da resistência (R2) do biomaterial para diferentes períodos de deposição da adesão da *Pseudomona Aeruginosa***

Fonte: (MARANGONI *et al.*, 2013c)

**Tabela 2 – Dados da Resistência da Solução “R1”, Capacitância di biofilme “CPE1” e Resistência do Biofilme “R2” para ajuste do Modelo de Circuito equivalente**

	Valor	Erro (%)	Valor	Erro (%)	Valor	Erro (%)	Valor	Erro (%)	Valor	Erro (%)	Valor	Erro (%)
<b>R1</b>	133,7	0,2454	133,7	0,26893	133,8	0,27816	133,8	0,2829	134	0,28878	134	0,27913
<b>CPE1-T</b>	8,24E-07	1,2174	8,07E-07	1,5332	7,97E-07	1,6942	7,92E-07	1,8327	7,77E-07	2,0224	7,64E-07	1,8918
<b>CPE1-P</b>	0,92276	0,15799	0,92401	0,19314	0,92447	0,21038	0,92443	0,22492	0,92542	0,24391	0,92613	0,22916
<b>R2 (Ohm)</b>	59615	12,324	46153	18,079	41027	21,5	35844	25,85	30059	31,655	31294	27,1
<b>Tempo (min)</b>	15		30		45		60		90		120	
	Valor	Erro (%)	Valor	Erro (%)	Valor	Erro (%)	Valor	Erro (%)	Valor	Erro (%)	Valor	Erro (%)
<b>R1</b>	133,6	0,26013	132,8	0,25039	132,4	0,2415	131,11	0,23039	130,2	0,24088	131,6	0,27739
<b>CPE1-T</b>	7,46E-07	1,5796	7,25E-07	1,3543	7,17E-07	1,2112	7,20E-07	0,96928	7,15E-07	0,86574	6,38E-07	1,0036
<b>CPE1-P</b>	0,95684	0,19462	0,92737	0,16986	0,92744	0,15388	0,92605	0,12714	0,92482	0,117	0,9185	0,1332
<b>R2 (Ohm)</b>	37468	18,814	43680	13,234	50067	10,606	64624	6,7846	82122	5,0247	93000	7,0229
<b>Tempo (min)</b>	180		300		360		480		600		1440	

### 6.1.3 Conclusões para Etapa 1 – cultivo e formação de biofilme em sistema estacionário

Foi apresentado um método ótico e eletroquímico para caracterização em tempo real da adesão microbiana de biofilmes em superfície de platina. Este método pode ser estendido para aplicação em metais de uso cotidiano em usinas hidrelétricas para avaliar principalmente tubulações do sistema de refrigeração das unidades geradoras. O grau de recobrimento da superfície da platina pela *Pseudomonas aeruginosa* foi monitorado por microscopia ótica. Ficou evidenciado que a superfície é totalmente recoberta com um biofilme após 24 h de contato entre a platina e o meio de cultivo inoculado com o micro-organismo. A caracterização da formação do biofilme sobre platina em tempo real foi feita usando um modelo de circuito equivalente incluindo componentes descrevendo os fenômenos eletroquímicos e associados às imagens óticas.

A produção de material polimérico extracelular, que auxilia as bactérias na adesão e formação do biofilme, pode estar ligada ao aumento da resistência do biofilme no sistema, pois, foi observado que a resistência do biofilme diminui inicialmente, aproximadamente 1,5h de exposição, e depois aumenta até atingir um estado estacionário após 10 h. As variações nos valores de resistência do biofilme

foram atribuídas às variações nas propriedades do biofilme associadas aos estágios de formação.

## **6.2 Etapa 2 – cultivo em fluxo**

### **6.2.1 Metodologia**

#### **6.2.1.1 Micro-organismo e meio de cultivo.**

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foram cultivadas em caldo de soja (TSB-*Tryptic Soy Broth*, Himedia, HiMedia Laboratories, Índia) a 37 ° C por 18 h. Para os experimentos de adesão bacteriana e desenvolvimento de biofilme, as células foram colhidas por centrifugação e lavadas duas vezes com sais mínimos M9 (STOODLEY *et al.*, 1997). Para os experimentos de adesão bacteriana o meio M9 foi suplementado com 2,0 g de glicose e 0,4940 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . A densidade celular do inóculo foi ajustada para aproximadamente  $10^8$  UFC / mL utilizando espectrofotômetro UV/visível (Shimadzu Corp.) em que uma densidade óptica na faixa entre 0,1 nm a 600 nm indicou  $10^8$  UFC / mL.

#### **6.2.1.2 Preparação do eletrodo de trabalho**

Eletrodos de platina (Bioanalytical Systems Inc.) com 1,6 mm de diâmetro foram utilizados para as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica e, lâminas de platina (1,0 mm x 1,0 mm x 0,1 mm) embutidas em resina epóxi (Figura 33) foram preparadas para as análises das imagens superficiais realizadas em banco metalográfico (Leica, modelo MM6). As lâminas foram polidas com pasta de diamante e de alumina. Os eletrodos permaneceram por 15 min em etanol a 70 % seguido de irradiação com luz ultravioleta (254 nm) por 15 min para o processo de esterilização.

#### **6.2.1.3 Adesão de bactérias e formação de biofilme**

Foi utilizado o sistema em fluxo apresentado no no capítulo 6 do presente trabalho, que encontra-se em processo de registro de patente. Para medidas de EIS o eletrodo de trabalho (platina), o contra eletrodo (platina) e o eletrodo de referência de fio de prata foram inseridos por acessos específicos do sistema na área de análise eletroquímica da câmara de cultivo (Figura 34). Foi utilizado fio de Prata como *pseudo* eletrodo referência, pois é conhecida as propriedades antibacterianas de partículas



de prata sobre micro-organismos (RADZIG *et al.*, 2013; MIRZAJANI *et al.*, 2014; MOCANU *et al.*, 2014) e neste caso minimizaria as modificações do referencial para que as medidas fossem mais fiéis às modificações no eletrodo de trabalho. Para a adesão inicial de células bacterianas na superfície da platina (Figura 33), o reator foi preenchido com o meio mínimo M9 suplementado com glicose e  $\text{MgSO}_4$  e o sistema foi inoculado no tempo 0 h com pré-inóculo ajustado ( $10^8$  UFC / mL) e, dessa forma, iniciou-se a fermentação com uma concentração de  $10^6$  UFC / mL em fluxo contínuo.

O sistema possui bombas dosadoras que garante a regularidade da injeção. Durante o experimento o sistema foi mantido em temperatura de 37 °C. As análises das imagens das superfícies das amostras óticas foram conduzidas no mesmo período de tempo das medidas de EIS, isto é, para cada imagem ótica há um espectro de impedância eletroquímica associado.

#### **6.2.1.4 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)**

Os experimentos foram realizados utilizando um potenciostato/galvanostato modelo PARSTAT 2273 (Princeton Applied Research) com módulo de impedância e um software PowerSuite®. As medidas serão realizadas na faixa de frequência entre 100 kHz a 100 mHz com amplitude do sinal de 10 mV. Para todas as medidas é aplicado um potencial DC de 0,0 V em relação ao potencial de circuito aberto, para minimizar o efeito da polarização sobre o processo de adesão das bactérias sobre a superfície da platina. Esse procedimento é adotado uma vez que uma polarização anódica pode causar uma contração no biofilme enquanto que uma polarização catódica pode causar uma menor expansão do biofilme (MAPELLI *et al.*, 2008). As medidas de EIE foram conduzidas em tempos de cultivo predeterminados entre 15 min e 24 h, em Temperatura de 37 °C. O tempo 0 h representa a condição sem bactéria, isto é, apenas o meio de cultivo M9 com seus suplementos. O meio de cultivo foi inoculado utilizando a bomba dosadora (Figura 29). Para efeitos de comparação dos diagramas de impedância, foram realizadas medidas antes da adição do inóculo, para verificar a influência do crescimento microbiano sobre a superfície da platina. O ajuste dos dados de impedância foram realizados pela análise de circuito equivalente utilizando o software Zview® (Scribner Associates Inc.).

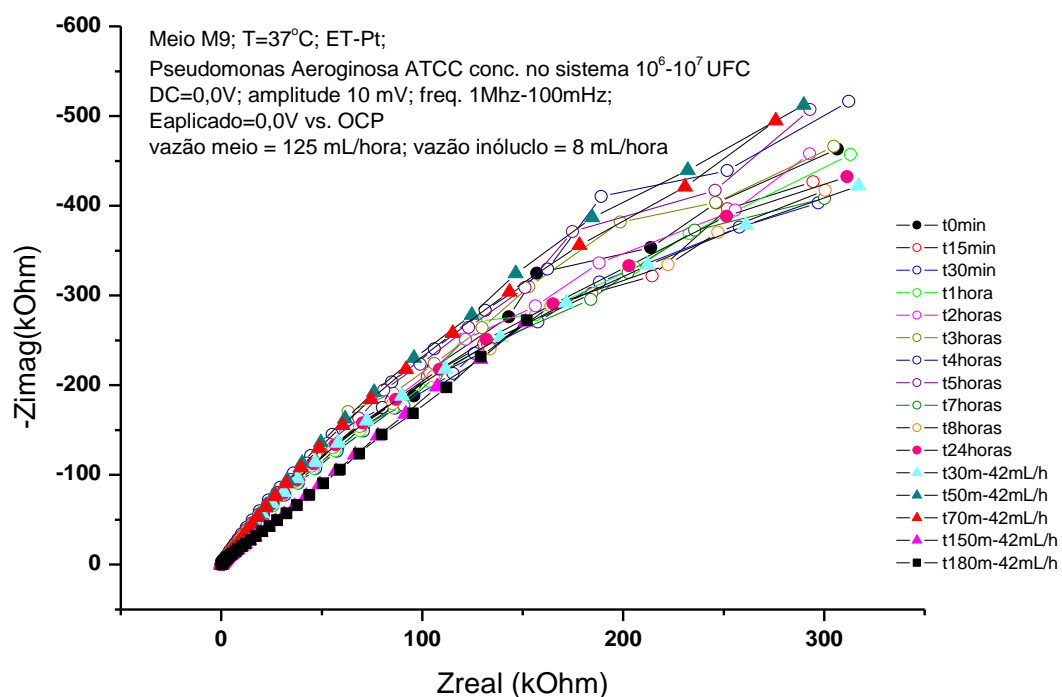
#### **6.2.1.5 Monitoramento do biofilme – descrição do sistema em fluxo**

A descrição do sistema utilizado com todas as especificações encontra-se melhor descrito no Capítulo 5.

##### **Medidas de potencial de circuito aberto em função do tempo**

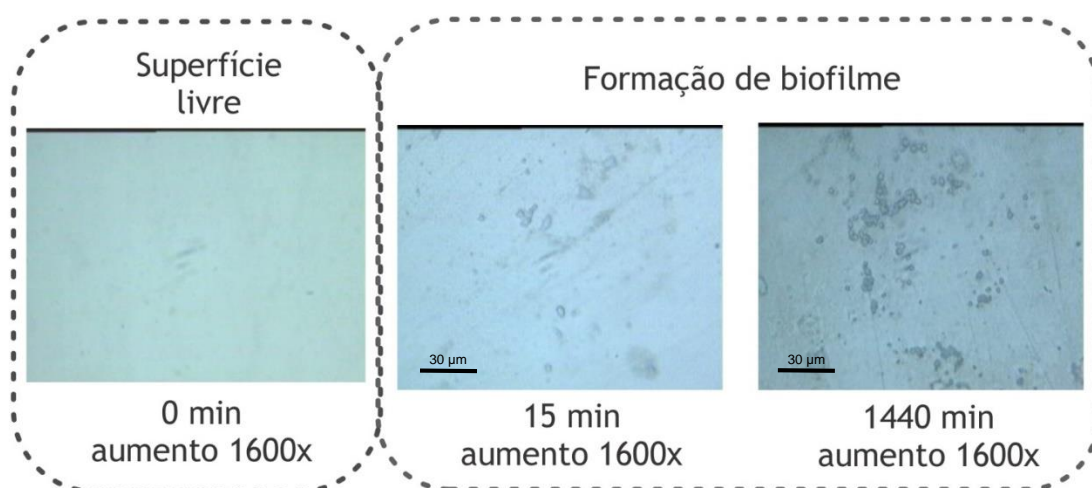
As medidas foram realizadas em fluxo laminar em um sistema composto por três eletrodos: eletrodo de trabalho (platina), eletrodo de referência (fio de prata) e um contra eletrodo (platina). O meio de cultivo M9 foi injetado no sistema por um período de 30 minutos a uma vazão de 125 mL/h e foi monitorado o potencial de circuito aberto do sistema utilizando um potenciostato/galvanostato da marca PAR modelo Parstat 2263. O potencial de circuito aberto oscilou entre -92 mV a -106 mV. Na sequência, foi adicionado simultaneamente ao sistema o inóculo (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) com concentração entre  $10^6$ - $10^7$  UFC/mL (sistema) na vazão de 8 mL/h. Com o sistema nesta condição de operação, isto é, meio M9 na vazão de 125 mL/h e inóculo na vazão de 8 mL/h, foram realizadas medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica-EIE em intervalos de tempo até atingir 24 horas de experimento. Periodicamente também foram realizadas medidas óticas em amostras de platina colocadas no sistema de medidas submetidas as mesmas condições do experimento.

Após 25 horas e 30 minutos de experimento, não foram observadas variações significativas na resposta das medidas de EIE, como apresentado na Figura 43. As imagens óticas corroboram com os resultados obtidos (Figura 44).



**Figura 43 - Espectros de Impedância Eletroquímica em diferentes tempos de ensaio**

Fonte: O Autor

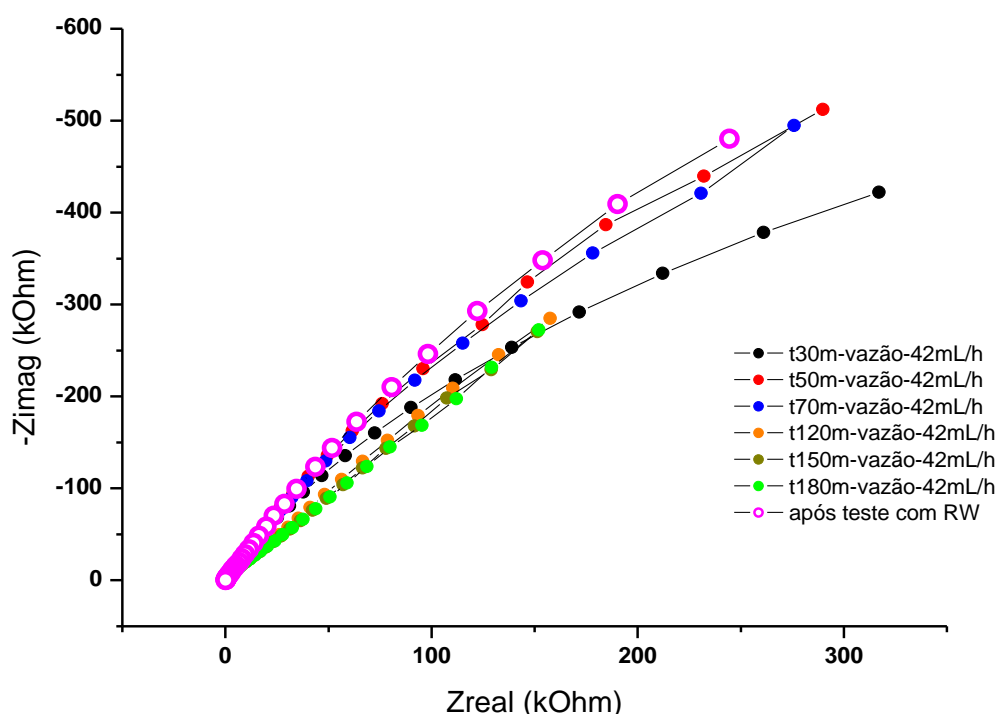


**Figura 44 - Imagem ótica da superfície da platina após 24h de ensaio**

Fonte: O Autor

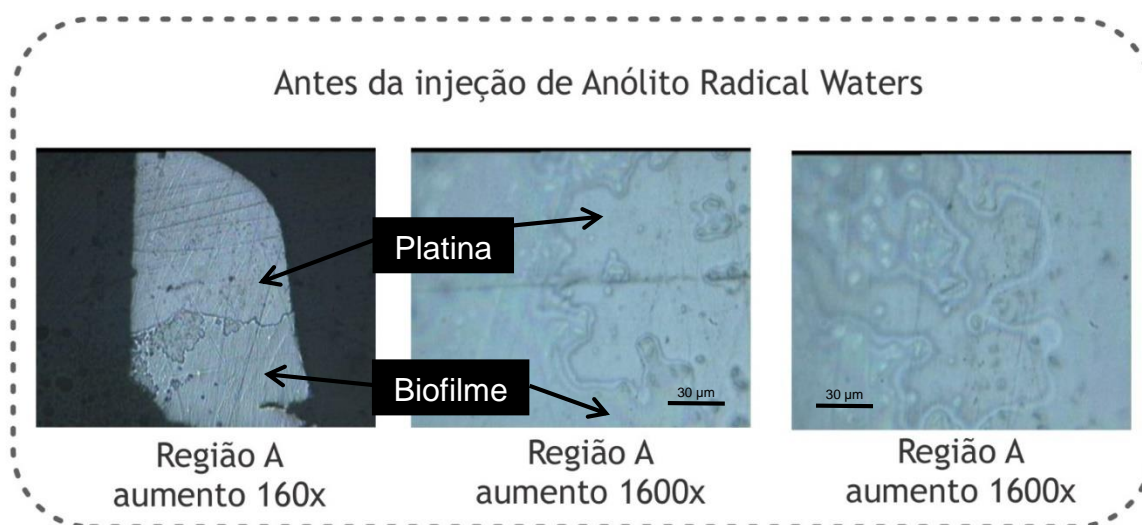
Com a intenção de acelerar o processo de adesão e a formação do biofilme alterou-se a vazão do inóculo, passando a vazão de 8 mL/h para 42 mL/h (concentração de  $10^8$  UFC/mL no sistema).

Após 70 minutos na vazão de 42 mL/min observou-se alteração nos espectros de EIE, como apresentado na Figura 45 (t 120 min, t 150 min e t 180 min). A imagem ótica da superfície da platina nesta condição está representada na Figura 46, onde se observa que a presença de grande quantidade de biofilme na superfície da platina.



**Figura 45 - Espectros de Impedância Eletroquímica após mudança na vazão do inóculo de 8 mL/h para 42 mL/h**

Fonte: O Autor



**Figura 46 - Imagem ótica da superfície da Platina após 1,5 h após mudança na vazão do inóculo de 8 mL/h para 42 mL/h**

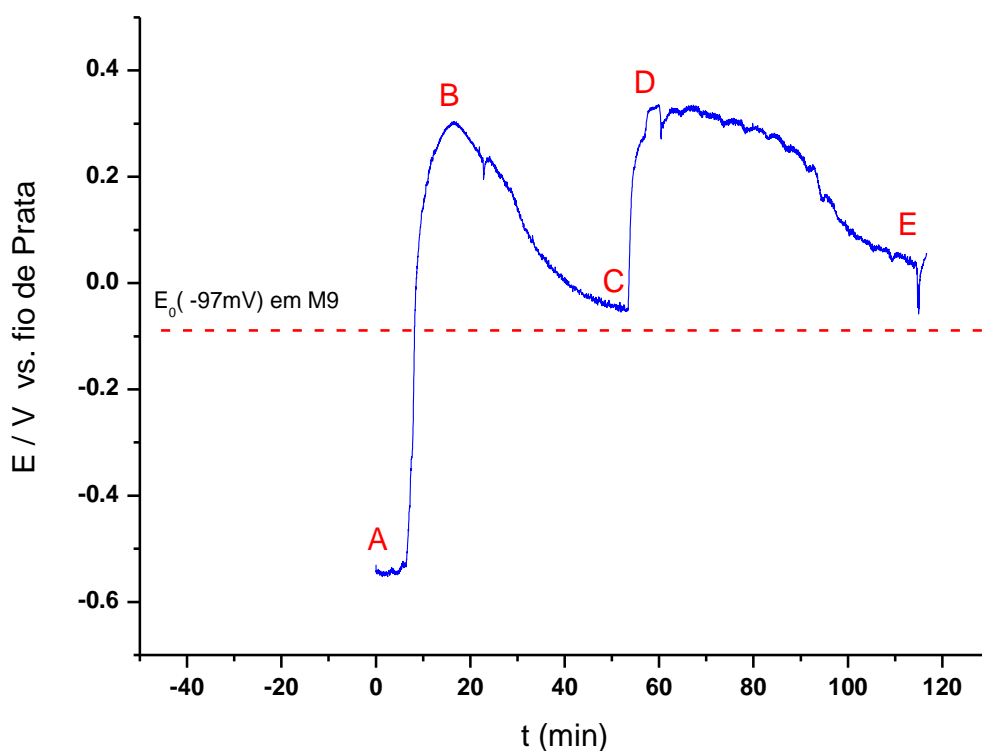
Fonte: Autor

**Nota: (corresponde a região A da Figura 47).**

#### 6.2.1.6 Teste com anólito do Reator ECA 2 da Radical Waters

Após o recobrimento de boa parte da superfície do eletrodo de trabalho com o biofilme, foi realizado o teste com o anólito obtido previamente do sistema da Radical Waters-RW, Reator ECA 2. As características obtidas para o anólito foram: ORP 852 mV, pH=6,8 e concentração de  $\text{Cl}_2$  livre de 33 ppm (conforme tabela Radical Waters). O experimento consistiu em substituir a injeção do inóculo pelo anólito, sendo que a vazão do anólito foi de 38 mL/h. Os resultados do experimento estão apresentados na Figura 47, que, apresenta a variação da diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência em função do tempo. A região indicada pela letra A corresponde a situação em que a superfície do eletrodo de trabalho (platina) está recoberta em boa parte com um biofilme, na condição de operação a uma vazão de meio M9 de 125 mL/h e inóculo de ATCC 27853 de 42 mL/h. A região entre A e B corresponde a situação em que a injeção de inóculo foi interrompida e iniciada a injeção de anólito da RW com concentração de 10 ppm e vazão de 38 mL/h. Observou-se uma variação significativa na diferença de potencial entre o eletrodo de

trabalho e o eletrodo de referência, com deslocamento para valores mais positivos. Na região entre B e C foi interrompido o fluxo de anólito e injetado somente o meio M9. A imagem ótica entre a região B e C está apresentada na Figura 48. O valor de potencial de circuito aberto atingido na região C corresponde ao potencial de repouso antes do início da injeção do inóculo e está representado pela linha horizontal pontilhada. Ou seja, corresponde ao potencial da interface Platina/Meio M9. Entre a região C e D foi novamente injetado no sistema a solução de anólito da RW e observou-se que o a diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência volta para os valores atingidos na região B, isto é, da interface Platina/Meio M9+Anólito. Logo após a região D, foi obtida uma imagem ótica a qual está apresentada na Figura 49.

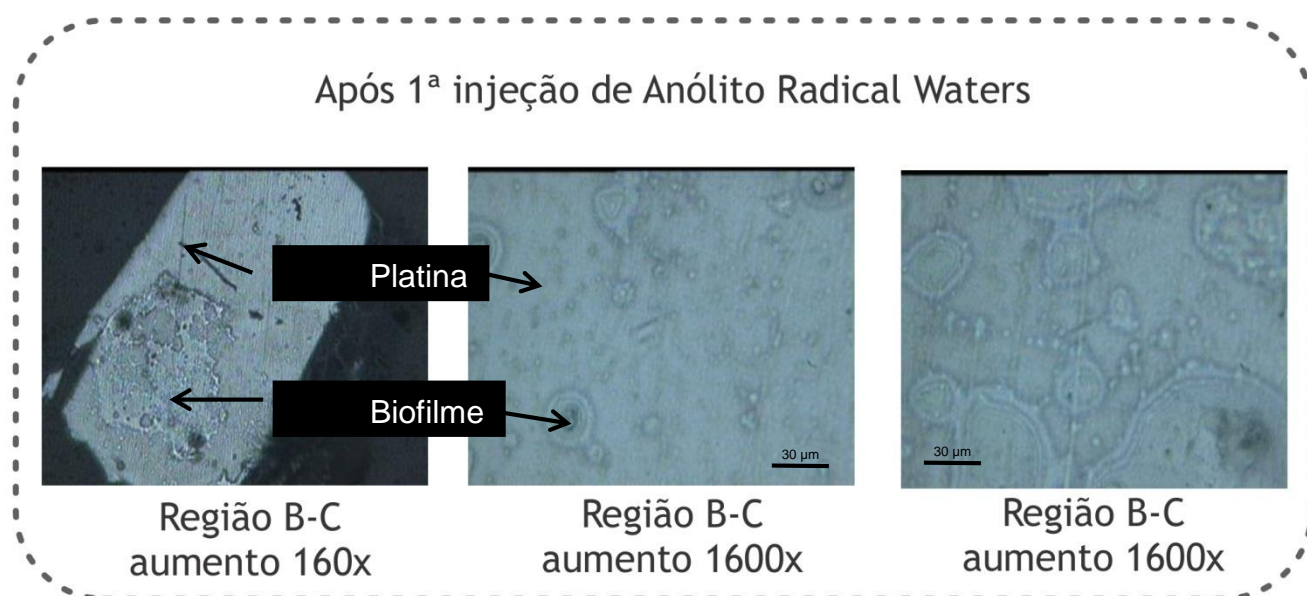


**Figura 47 - Variação do potencial de circuito aberto em função do tempo**

Nota: (A) = solução M9ATCC após 25h30min vazão 8 mL seguido de 180 min vazão 42mL/h de inóculo; (A → B) = M9 + adição de solução Radical Water (10ppm)

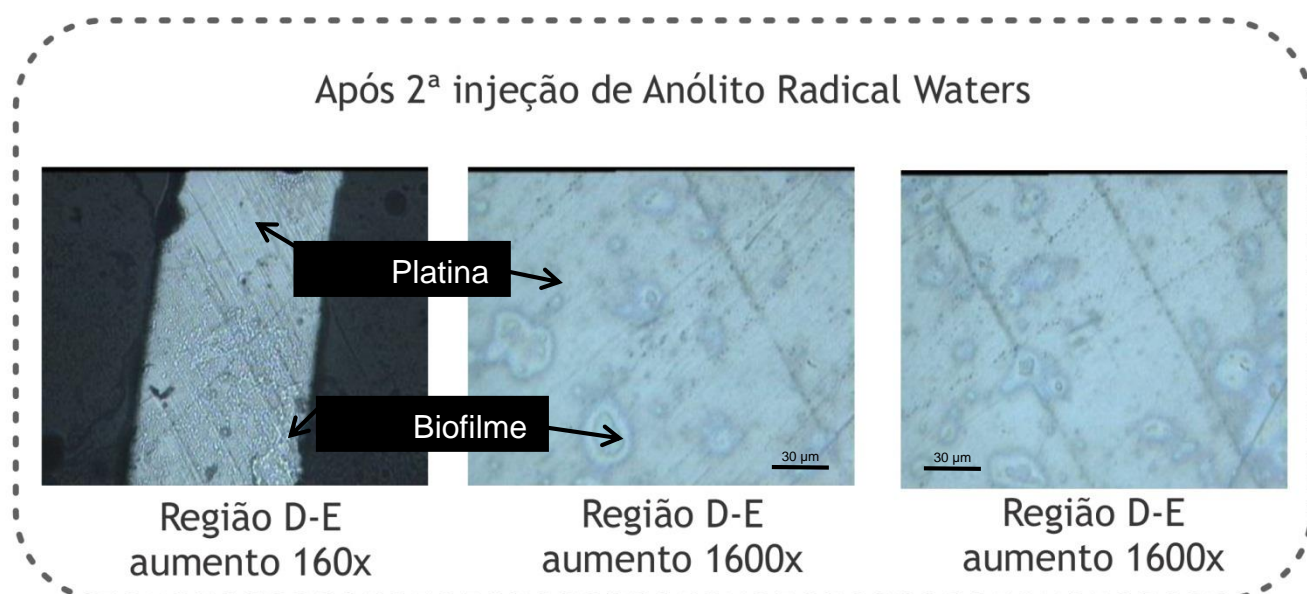
- sem ATCC; (B → C) = M9 sem adição de RW; (C → D) = M9 e nova adição de RW 10ppm; (D → E) = M9 sem adição de RW e nova adição de ATCC

Fonte: O Autor



**Figura 48 - Imagem ótica da superfície da Platina após a primeira injeção de anólito da Radical Waters (região B - C)**

Fonte: O Autor



**Figura 49 - Imagem ótica da superfície da Platina após a segunda injeção de anólito da Radical Waters (região D - E)**

Fonte: O Autor

Nos testes realizados em sistema em fluxo observou-se a adesão de bactérias *Pseudomonas Aeruginosa* e a formação de biofilme após 1,5 h com uma vazão de meio M9 de 125 mL/h e vazão de 42 mL/h de inóculo. A adição de anólito obtido do sistema da Radical Waters no sistema em fluxo agiu sobre o biofilme contribuindo na fragilização e eliminação do biofilme sobre a superfície do eletrodo de trabalho (platina). É importante ressaltar que os testes realizados foram preliminares, assim, testes adicionais em condições controladas deveriam ser realizados para mostrar de modo quantitativo a eficácia do produto na remoção de biofilmes



## CONCLUSÕES

Para a Caracterização dos biofilmes formados sobre as superfícies dos metais, em corpos-de-prova instalados e retirados em diferentes períodos do ano, avaliando principalmente os micro-organismos presentes e potencialmente perigosos para a degradação de materiais, foram realizadas contagens microbiológicas para Bactérias totais e Fungos, onde foi possível determinar o nível de colonização sobre o metal UFC/m<sup>2</sup>. As contagens foram realizadas em dois períodos sendo as Coletas de 1 a 4 com comparativos da utilização de Hipoclorito de Cálcio na Usina e Coletas 5 e 6 com a aplicação de MXD-100. Para ambos não houve diferença significativa entre as máquinas que recebiam os produtos e as que não recebiam. Foram isoladas 358 bactérias das famílias *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Micrococcaceae* e *Bacillaceae*. Verificou-se a presença de bacilos Gram-positivos, bacilos Gram-negativos, cocobacilos Gram-negativos, cocos Gram-positivos, bactérias filamentosas Gram-positivas e Gram-negativas. Além disso foram isolados 94 fungos isolados pertencentes aos gêneros *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp, *Acremonium* sp, *Paecilomyces* sp, *Phoma* sp, *Blastomyces* sp, *Alternaria* sp, *Cladosporium* sp, *Chrysosporium* sp, *Nigrospora* sp, *Trychophyton* sp e *Rhizoctonia* sp. Foi confirmada a Presença de bactérias oxidantes do Ferro (Ferrobactérias) na Máquina 15 a partir da coleta 2 a 4 e posteriormente nas máquinas 6 (antes e após injeção de biocida) nas coletas 3 e 4, entretanto nas coletas 5 e 6 quando era aplicado o produto MXD-100 observou-se resultado negativo nas mesmas máquinas indicando a ausência de Ferrobactérias nos CP's coletados, exceto na coleta 6 na máquina 6 antes do sistema de injeção. Foi confirmada a Presença de Bactérias Redutoras de Sulfato em todas as máquinas testadas entre as coletas 2 a 4 e posteriormente nas coletas 5 e 6.

Sobre o Desenvolvimento de metodologia que permita a avaliação de produtos para melhor limpeza dos sistemas afetados pela formação de biofilmes. Foram selecionados agentes químicos usualmente aplicados em sistemas de refrigeração de indústrias ou usualmente aplicados para desinfecção de superfícies e foram utilizadas linhagens padrão que possuem relação com as bactérias isoladas dos CP's coletados, para que pudéssemos ter possibilidade de seguir procedimento padrão da ANVISA para avaliação de agentes antimicrobianos. Observou-se que o produto MXD-100, da

empresa MAX Clean, apresenta resultados significativos no controle da formação de biofilme nas duas concentrações testadas, 1ppm e 3ppm. Também é possível verificar que existem outras opções como a utilização de NaOH para alteração do pH do meio para pH 9 e pH 12. Estes compostos foram eficientes tanto quanto água sanitária comercial a 3ppm, que é usualmente conhecido como um excelente sanitizante de superfícies. Normalmente são aplicados em Usinas produtos com o mesmo princípio que a água sanitária, tais como Hipoclorito de Cálcio, Hipoclorito de Sódio e Dicloro. Os testes realizados no presente trabalho evidenciaram percentual de controle de bactérias formadoras de biofilme para o Hipoclorito de Cálcio a 3ppm menos eficientes que o MXD, mas significativamente similares a compostos comerciais usualmente aplicados em sistemas de limpeza de superfícies, mas atualmente buscam-se novas moléculas para evitar a utilização deste composto em sistemas abertos, onde existe a possibilidade de Cloro livre ser descartado em águas naturais. Em sistemas fechados pode ser utilizado Glutaraldeído, porém este composto apresenta grande toxicidade, assim, neste trabalho, o mesmo foi utilizado apenas para fins de comparação, uma vez que é normalmente empregado a 50ppm em sistemas de torre de resfriamento, onde não existe circulação aberta. Este composto apresentou eficiência na concentração de 1ppm, mas a utilização do anólito do sistema da “Radical Water” a 10ppm possui características desejáveis para a aplicação industrial. Seu princípio ativo é baseado na ação do ácido hipocloroso, que é menos nocivo que o hipoclorito, e não necessita de armazenamento de nenhum produto químico regulado, como Hidróxido de Sódio. Sua produção é baseada na eletrólise da água em sistema comercializado pela empresa e necessita apenas de energia elétrica e solução condutora de NaCl a 2,5% livre de iodo. Dessa forma, não existe a dependência de um produto específico de uma empresa para manutenção do sistema de resfriamento. Outros compostos baseados em fontes naturais mostram um resultado interessante, mas são necessários mais estudos para viabilizar sua utilização em sistemas industriais, visando contornar problemas como seu custo e/ou solubilidade em água.

Foi desenvolvido um sistema em fluxo contínuo para monitoramento da formação de biofilme em substrato sólido por técnicas microscópicas e eletroquímicas que possui como princípio básico propiciar a formação de um sistema em fluxo contínuo

de monitoramento em estrutura própria e específica que permite análises microscópicas e/ou espectroscopia por infravermelho dos micro-organismos aderidos à superfície alvo, além de análises eletroquímicas das alterações na interfase substrato sólido/líquido circulante - formação de biofilme sobre substrato sólido, com vistas a possibilitar de forma extremamente prática, segura e precisa uma completa otimização no conjunto de procedimentos destinados a avaliar o padrão de adesão e evolução do biofilme utilizam-se técnicas microscópicas e espectroscopia por infravermelho e eletroquímicas que permitem identificar os parâmetros importantes no processo de colonização e maturação do biofilme sobre os substratos sólidos, ou seja, auxiliar as pesquisas e o desenvolvimento de estratégias para o controle da corrosão de superfícies influenciada por micro-organismos e, tendo como base, um sistema em fluxo contínuo de monitoramento com grande resistência, segurança e versatilidade. Com design e formato específico e de fácil acesso para melhor adaptação e segurança dos usuários, características de praticidade no manuseio e funcionalidade, de custos bastante acessíveis e, devido as suas características gerais e dimensões, facilmente adaptável a uma vasta gama de biofilmes, substratos sólidos, locais e usuários em geral, independentes das características que estes apresentem. Este sistema foi utilizado para teste do anólito da Radical Water (RW) e adição de anólito obtido do sistema da RW no sistema em fluxo foi eficaz na atuação sobre o biofilme de modo a contribuir na fragilização e eliminação do biofilme sobre a superfície do eletrodo de trabalho (platina). É importante ressaltar que os testes realizados foram preliminares, assim, testes adicionais em condições controladas deveriam ser realizados para mostrar de modo quantitativo a eficácia do produto na remoção de biofilmes, além de testes em campo que refletiriam de forma real o potencial do produto

## **TRABALHOS FUTUROS**

Com o presente trabalho é possível apontar alguns desenvolvimentos adicionais que podem ser realizados como consequência dos resultados obtidos:

- Desenvolvimento de biosensores eletroquímicos para monitoramento da formação de biofilmes em sistemas de trocadores de calor em usinas hidrelétricas, para utilização como sistema de “feed bak” ao sistema de dosagem de biocidas

- Desenvolvimento de biocida a base de compostos naturais, principalmente que utilize Azadiractin, princípio ativo da Planta Neem que possui atividade antimicrobiana. Este composto deve ser utilizado em conjunto com outros compostos, mas pode ser um potencial substituto de compostos químicos atualmente empregados
- Padronização de espectroscopia de infravermelho acoplado à microscópio para avaliação química dos eletrodos utilizados no sistema de cultivo em fluxo contínuo, patente apresentada no presente trabalho

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEEL, AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA., Banco de Informações de Geração - BIG. Disponível em: [www.aneel.gov.br](http://www.aneel.gov.br). 2014.

ALPAT, Ş.; ALPAT-KILINÇ, S.; ÇADIRCI, B. H.; YASA, İ.; TELEFONCU, A. A novel microbial biosensor based on *Circinella* sp. modified carbon paste electrode and its voltammetric application. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 134, n. 1, p.175–181, 2008.

ANDRADE, N.J.; BRIDGEMAN, T.A.; ZOTTOLA, E.A. Enterococcus faecium attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v. 61, p.833–838, 1998.

ANGUIGE, K., KING, J.R., WARD, J.P. A multi-phase mathematical model of quorum sensing in a maturing *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Mathematical Biosciences**, v. 203, p.240–276, 2006.

APHA, AWWA, WPCF, **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater** 20th ed. L. S. CLERSCERL, A. E. GREENBERG, A. D. EATON, eds., Washington: **American Public Health Association**. 2005.

ASHOK, M., THANGAVEL, K., ANANDAPANDIAN, K. Production and Characterization of Exopolysaccharides ( EPS ) from Biofilm Forming Marine Bacterium. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, p.259–265, 2011.

ABRACO, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CORROSÃO. Palestra sobre a Nova ABRACO de Jorge Fernando Pereira Coelho, vice presidente da ABRACO. Disponível em: <http://www.abraco.org.br/NAbracoP/slide0.htm>, 2012.

ASTM, **Conducting Potentiodynamic Polarization Resistance Measurements**, ASTM-G59, DOI:10.1520/G0059-97R09.2, 2009.

ASTM, **Standard Guide for Online Monitoring of Corrosion in Plant Equipment ( Electrical and Electrochemical Methods )**, ASTM-G96-90, DOI: 10.1520/G0096-90R08.2, 2008.

ASTM, **Standard Practice for Calculation of Corrosion Rates and Related Information from Electrochemical Measurements**, ASTM-G102-89, DOI: 10.1520/G0102-89R10.2, 2010a.

ASTM, **Standard Practice for Conventions Applicable to Electrochemical Measurements**, ASTM-G3-89, DOI: 10.1520/G0003-89R10.2, 2010b.

ASTM, **Standard Quantitative Disk Carrier Test Method for Determining Bactericidal , Virucidal , Fungicidal , Mycobactericidal , and Sporocidal Activities of Chemicals 1**, ASTM-E2197-11, DOI: 10.1520/E2197-11.2, 2011.

ASTM, **Standard Test Method for Evaluating Disinfectant Efficacy against Pseudomonas aeruginosa Biofilm Grown in CDC Biofilm Reactor using Single Tube Method**, ASTM-E2871-12, DOI: 10.1520/E2871, 2012a.

ASTM, **Standard Test Method for Quantification of a Pseudomonas aeruginosa Biofilm Grown Using a Drip Flow Biofilm Reactor with Low Shear and Continuous Flow**, ASTM-E2647-08, DOI: 10.1520/E2647-08.2, 2012b.

ASTM, **Standard Test Method for Quantification of Pseudomonas aeruginosa Biofilm Grown with High Shear and Continuous Flow using CDC Biofilm**, ASTM-E2562-12, DOI: 10.1520/E2562-12.2, 2012c.

ASTM, **Standard Test Method for Quantification of Pseudomonas aeruginosa Biofilm Grown with Medium Shear and Continuous Flow Using Rotating Disk Reactor**, ASTM-E2196-12, DOI: 10.1520/E2196-12.2, 2012d.

ASTM, **Standard Test Method for Testing Disinfectant Efficacy against Pseudomonas aeruginosa Biofilm using the MBEC Assay**, ASTM-E2799-12, DOI: 10.1520/E2799, 2012e.

ÁVILA, B.E.F.; PEDRERO, M.; CAMPUZANO, S.; ESCAMILLA-GÓMEZ, V.; PINGARRÓN, J. M. Sensitive and rapid amperometric magnetoimmunosensor for the determination of staphylococcus aureus. **Anal Bioanal Chem**, v. 403, n. 4, p.917–925. 2012.

BARANOWSKI, J.D.; DAVIDSON, P. M.; NAGEL, C. W.; BRANEN, A. L. Inhibition of saccharomyces cerevisiae by natural occurring hydroxycinnamates. **J. of Food Sci.**, v. 45, p.592–594. 2006.

BARNETT, H.C., HUNTER, B.B., **Illustrated genera of imperfect fungi** 3rd ed., Minneapolis: **Burgess Publications**, 1987.

BASSLER, B.L., How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p.582–587, 1999.

BAUER, W., ROBINSON, J.B. Disruption of bacterial quorum sensing by other organisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p.234–237, 2002.

BAYOUDH, S.; OTHMANE, A.; PONSONNET, L.; BEN OUADA, H. Electrical detection and characterization of bacterial adhesion using electrochemical impedance spectroscopy-based flow chamber. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 318, n. 1-3, p.291–300, 2008.

BEECH, I.B.; ZINKEVICH, V.; TAPPER, R.; GUBNER, R.; AVCI, R. Study of the interaction of sulphate-reducing bacteria exopolymers with iron using X-ray

photoelectron spectroscopy and time-of-flight secondary ionisation mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods**, v. 36, n. 1-2, p.3–10, 1999.

BEECH, I.B.; CHEUNG, C.W.S. Interactions of exopolymers produced by sulphate-reducing bacteria with metal ions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 35, n. 1-3, p.59–72, 1995.

BEECH, I.B.; GAYLARDE, C.C. Recent advances in the study of biocorrosion - an overview. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p.177–190, 1999.

BEN-YOAV, H.; FREEMAN, A.; STERNHEIM, M.; SHACHAM-DIAMAND, Y. An electrochemical impedance model for integrated bacterial biofilms. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 23, p.7780–7786, 2011.

BERTON, M.A.C.; GARCIA, C.M. Estação de avaliação e monitoramento de corrosão microbiológica e eletroquímica em rios e similares. PI 1000751-2 , 35p, 2010.

BETTAIEB, F.; PONSONNET, L.; LEJEUNE, P.; OUADA, H.B.; MARTELET, C.; BAKHROUF, A.; JAFFRÉZIC-RENAULT, N.; OTHMANE, A. Immobilization of *E. coli* bacteria in three-dimensional matrices for ISFET biosensor design. **Biotechniques**, v. 11, n. 6, p.739–740, 742–743, 1991.

BOBACKA, J., IVASKA, A., LEWENSTAM, A. A Potentiometric ion sensors. **Chem Rev**, v. 108, p.329–351, 2008.

BONFIELD, J.; BONFIELD, J.; BEAL, K.; JORDAN, M.; CHENG, Y.; STADEN, R. **The STADEN PACKAGE Manual**, London, UK: **Medical Research Council**, 2002.

BRASILEIRO, A.C.M., CARNEIRO, V.T.C. **Manual de transformação Genética de Plantas**, Brasília: **EMBRAPA-Cenargen**, 1998.

BRYANT, R.D.; JANSEN, W.; BOIVIN, J.; LAISHLEY, E. J.; COSTERTON, J. W. Effect of hydrogenase and mixed sulfate-reducing bacterial populations on the corrosion of steel. **Applied and environmental microbiology**, v. 57, n. 10, p.2804–9, 1991.

BUCHANAN, R.E., GIBBONS, N.E. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology** 8<sup>a</sup> ed., Baltimore: **Williams & Wilkins**, 1974.

CAMPS, M.; BRIAND, J.; GUENTAS-DOMBROWSKY, L.; CULIOLI, G.; BAZIRE, A.; BLACHE, Y. Antifouling activity of commercial biocides vs . natural and natural-derived products assessed by marine bacteria adhesion bioassay. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 5, p.1032–1040, 2011.

CARAVELLI, A.H., GIANNUZZI, L., ZARITZKY, N. Reduction of hexavalent chromium by *Sphaerotilus natans* a filamentous microorganism present in activated sludges. **Journal of Hazardous Materials**, v. 1-3, p.214–222, 2008.

CHOPP, D.L.; KIRISITS, M. J.; MORAN, B.; PARSEK, M. R.; The Dependence of Quorum Sensing on the Depth of a Growing Biofilm. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 65, p.1053–1079, 2003.

CHOTEAU, C.; DZYADEVYCH, S.; DURRIEU, C.; CHOVELON, J. M. A bi-enzymatic whole cell conductometric biosensor for heavy metal ion and pesticides detection in water samples. **Biosensors & bioelectronics**, v. 21, p.273–281, 2005.

CHOTEAU, C.; DZYADEVYCH, S.; CHOVELON, J. M.; DURRIEU, C. Development of novel conductometric biosensors based on immobilized whole cell *Chlorella vulgaris* microalgae. **Biosensors & bioelectronics**, v. 19, p.1089–1096, 2004.

COENYE, T., NELIS, H.J. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 83, n. 2, p.89–105, 2010.

COETSER, S.E., CLOETE, T.E. Biofouling and biocorrosion in industrial water systems. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 31, n. 4, p.213–232, 2005.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, RESOLUÇÃO CONAMA Nº 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005, 2005.

COSTA, E.T.R. **Dissertação de mestrado em microbiologia veterinária.” Desenvolvimento de metodologia para detecção da adesão microbiana em superfície de aço inoxidável.** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1999.

COSTERTON, J.W., STEWART, P.S., GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p.1318–1322, 1999.

CRIADO, M.T., SUÁREZ, B., FERRERÓS, C.M. The importance of bacterial adhesion in dairy industry. **Food Technology**, v. 48, p.123–126, 1994.

D’SOUZA, S.F. Microbial Biosensors. **Biosensors & bioelectronics**, v. 16, p.337–353, 2001.

DALY, K., SHARP, R.J., MCCARTHY, A J. Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria. **Microbiology**, v. 146, n. 7, p.1693–1705, 2000.

DAUMAS, S., MASSIANI, Y., CROUSIER, J. Microbiological battery induced by sulphate-reducing bacteria. **Corrosion Science**, v. 28, p.1041–1050, 1988.

DEFOIRDT, T.; CRAB, R.; WOOD, T. K.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W.; BOSSIER, P. Quorum Sensing-Disrupting Brominated Furanones Protect the Gnotobiotic Brine Shrimp *Artemia franciscana* from Pathogenic *Vibrio harveyi*, *Vibrio campbellii*, and *Vibrio parahaemolyticus* Isolates. **Appl Environ Microbiol**, p.6419–6423, 2006.



DEVEREUX, R.; KANE, M. D.; WINFREY, J.; STAHL, D. A. Genus- and group-specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria. **System Applied Microbiology**, v. 15, p.601–609, 1992.

DEVEREUX, R., HINES, M.E., STAHL, D.A.S. Cycling characterization of natural communities of sulfate-reducing bacteria by 16S rRNA sequence comparisons. **Microbial Ecology**, v. 32, p.283–292, 1996.

DING, L.; DU, D.; ZHANG, X. J.; JU, H. X. Trends in cell-based electrochemical biosensors. **Curr Med Chem**, v. 15, n. 30, p.3160–3170, 2008.

DINH, H.T.; KUEVER, J.; MUßMANN, M.; HASSEL, A. W. Iron corrosion by novel anaerobic microorganisms. **Nature**, v. 427, p.829–832, 2004.

DOLAN, R.M., COSTERTON, J.W., Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Review**, v. 15, p.167–193, 2002.

DORAN, P.M. **Bioprocess Engineering Principles**, Elsevier, 439p, 1995.

EDYVEAN, R.G.J.; BENSON, J.; THOMAS, C. J.; BEECH, I. B.; VIDELA, H, A, Biological influences on hydrogen effects in steel in seawater. **Materials Performance**, v. 37, p.40–44, 1998.

EGUÍA, E.; TRUEBA, A.; RÍO-CALONGE, B.; GIRÓN, A.; BIELVA, C. Biofilm control in tubular heat exchangers refrigerated by seawater using flow inversion physical treatment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, n. 2, p.79–87, 2008.

ELVERS, K.T., LAPPIN-SCOTT, H.M., Biofilms and Biofouling. In M. SCHAECHTER e J. LEDERBERG, eds. **The Desk Encyclopedia of Microbiology**. London, UK: Elsevier Academic Press, p. 161–167, 2004.

FACCIOTTI, M.C.R. Fermentação contínua. In W. SCHMIDELL ET AL., eds. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgar Blucher, p. 223–246, 2001.

FERNANDES, J.C.B., KUBOTA, L.T. Eletrodos íon-seletivos: histórico, mecanismo de resposta, seletividade e revisão dos conceitos. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p.120–130, 2001.

FERRINI, A.M.; MANNONI, V.; CARPICO, G.; PELLEGRINI, G. E. Detection and identification of beta-lactam residues in milk using a hybrid biosensor. **J Agric Food Chem**, v. 56, n. 3, p.784–788, 2008.

FHWA, NACE, **Corrosion costs and preventive strategies in the United States**, 2002.

FINNEGAN, M.; LINLEY, E.; DENYER, S. P.; MCDONNELL, G.; SIMONS, C.; MAILLARD, J. Y. Mode of action of hydrogen peroxide and other oxidizing agents:

differences between liquid and gas forms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p.2108–2115, 2010.

FLEMMING, H.C., WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8,n. 9, p.623–33, 2010.

FUQUA, C. Quorum sensing in gram-negative bacteria. In M. Schaechter & J. Lederberg, eds. **The Desk Encyclopedia of Microbiology**. London, UK: **Elsevier Academic Press**, p. 859–864, 2004.

GAGNON, G.A.; RAND, J. L.; LEARY, K. C. O.; RYSEL, A. C.; CHAURET, C.; ANDREWS, R. C. Disinfectant efficacy of chlorite and chlorine dioxide in drinking water biofilms. **Water Research**, v. 39, p.1809–1817, 2005.

GARCÍA-ALJARO, C., MUNOZ-BERBEL, X., MUNOZ, F.J. On-chip impedimetric detection of bacteriophages in dairy samples. **Biosens. Bioelectron**, v. 24, p.1712–1716. 2009.

GAYLARDE, C.C.; VIDELA, H.A., Biocidal control of metals and corrosion.” 1st Pan-American congress on Corrosion and Protection (AAC-NACE). In Mar del Plata, p. 371–378, 1992.

GELINSKI, J.M.L.N.; ROSA, J. C. D.; DUQUESNE, E. F. A. P.; BARATTO, C. M. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) e de seu composto ativo nerolidol em combinação ao EDTA ou lisozima. **Evidência**, v. 7, p.131–144, 2007.

GENTIL, V., **Corrosão** 6ed ed., Rio de Janeiro: **Livros Técnicos e Científicos Editora LTDA**, 2011.

GILBERT, P.; MOORE, L.E. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. **J Appl Microbiol**, v. 99, n. 4, p.703–715, 2005.

GILLIVER, K., OSBORN, E.M., Substances from seeds plants. In Antibiotics. London, UK: **Oxford University Press**, p. 576–628. 1994.

GIORDANI, S., NEVES, P.S., ANDREOLI, C. V. *Limnoperna fortunei* ou mexilhão dourado: impactos causados, métodos de controle passíveis de serem utilizados e a importâncias do controle de sua disseminação. In 23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005.

GONÇALVES, J.J., GOVIND, R. Rapid evaluation of biofilm attachment promoters and biofilm growth orientation using a mini-impedimetric device. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 143, n. 1, p.341–348, 2009.

GORMAN, J., AREY, M., KOCH, G., **Cost of Corrosion in the electric power industry**, 2001.

GÖRS, S.; SCHUMANN, R.; HÄUBNER, N.; KARSTEN, U. Fungal and algal biomass in biofilms on artificial surfaces quantified by ergosterol and chlorophyll a as biomarkers. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 60, n. 1, p.50–59, 2007.

GUEDRI, H., DURRIEU, C. A self-assembled monolayers based conductometric algal whole cell biosensor for water monitoring. **Microchim Acta**, v. 163, p.179–184, 2008.

GUIAMET, P.S., GÓMEZ DE SARAVIA, S.G. Laboratory Studies of Biocorrosion Control Using Traditional and Environmentally Friendly Biocides. **Latin American Applied Research**, v. 300, n. 4, p.295–300, 2005.

HAZEN, E.L., GORDON, M.A., REED, F.C. **Laboratory identification of pathogenic fungi simplified** 3<sup>a</sup> ed., **Springfield**. 1973.

HEISEY, R.M., GORMAN, B.K. Antimicrobial effects of plant extracts on *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Trichiphyton rubrun* and other microorganisms. **Lett. Appl. Microb.**, v. 14, p.136–139, 1992.

HÉQUET, A.; HUMBLLOT, V.; BERJEAUD, J.; PRADIER, C. Optimized grafting of antimicrobial peptides on stainless steel surface and biofilm resistance tests. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 2, p.301–309, 2011.

HERRERA, T., ULLOA, M. **El reino de los hongos** 1<sup>a</sup> ed., México: **Micología básica y aplicada**, 1990.

HEURLIER, K., DÉNERVAUD, V., HAAS, D. Impact of quorum sensing on fitness of *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 296, p.93–102, 2006.

HONG, H.; XIONG, Y.; RUAN, M.; LIAO, F.; LIN, H.; LIANG, Y. Factors affecting THMs, HAAs and HNMs formation of Jin Lan Reservoir water exposed to chlorine and monochloramine. **Science of The Total Environment**, v. 444, p.196–204, 2013.

HONG, H.C.; LIANG, Y.; HAN, B. P.; MAZUMDER, A.; WONG, M. H. Modeling of trihalomethane (THM) formation via chlorination of the water from Dongjiang River (source water for Hong Kong's drinking water). **Science of The Total Environment**, v. 385, n. 1-3, p.48–54, 2007.

HOOG, S. **Atlas of Clinical Fungi**, 2<sup>nd</sup> ed, Holanda: Amer Society for Microbiology, 1126p, 2000.

HUECK, H.J. The Biodeterioration of Materials - an appraisal, In: **Biodeterioration of Materials**, London, UK: **Elsevier**, pp 6-12, 1968.

IVERSON, I.P., OLSON, G.J. Anaerobic corrosion by sulfate-reducing bacteria due to highly reactive volatile phosphorus compound. In: **Microbial Corrosion**, London: **Metal Society**, p.46–53. 1983.

- KERN, M.E., BLEVINS, K.S. **Micologia médica** 2nd ed., São Paulo: **Premier**, 1999.
- KIEVIT, T.R. DE, IGLEWSKI, B.H. Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. **Infection Immunity**, v. 68, n. 9, pp 4839-4849, 2000.
- KIM, S.; YU, G.; KIM, T.; SHIN, K.; YOON, J. Rapid bacterial detection with an interdigitated array electrode by electrochemical impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta**, v. 82, p.126–131, 2012.
- KIM, T.; KANG, J.; LEE, J-H.; YOON, J. Influence of attached bacteria and biofilm on double-layer capacitance during biofilm monitoring by electrochemical impedance spectroscopy. **Water research**, v.45, n. 15, p.4615–22, 2011.
- KLICH, M.A., PITT, J.I., **A laboratory guide to the common Aspergillus species an their Teleomorphs**, Austrália: **Commonwealth Scientific and Industrial Research**, 1988.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S. D.; DOWELL, V. R.; JANDA, W. M.; SOMMERS, H. M.; WINN, W. C. **Diagnóstico microbiológico**, Ed **Guanabara Koogan**, 2008.
- KRISHNA, A., BANERJEE, A., Antimicrobial screening of some Indian spices. **Phyther. Res**, v. 13, n. 7, p.616–618, 1999.
- KUMAR, S.; KUNDU, S.; PAKSHIRAJAN, K.; DASU, V. V. Cephalosporins determination with a novel microbial biosensor based on permeabilized *Pseudomonas aeruginosa* whole cells. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 151, n. 2-3, p.653–664, 2008.
- LANE, D.L.; PACE, B.; OLSEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of National Academy of Science**, v. 82, p.6955–6959, 1985.
- LANGSRUD, S.; SIDHU, M. A.; HEIR, E.; HOLCK, A. L. Bacterial disinfectant resistance - a challenge for the food industry. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, p.283–290, 2003.
- LARONE, D.H., **Medically important fungi: a guide to identification**, New York: **Elsevier**. 1987.
- LAVANIA, M.; SARMA, P. M.; MANDAL, A. K.; CHEEMA, S.; LAL, B. Efficacy of natural biocide on control of microbial induced corrosion in oil pipelines mediated by *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio gigas*. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 8, p.1394–1402, 2011.
- LEI, Y.; MULCHANDANI, P.; CHEN, W.; MUCHANDANI, A. Biosensor for direct determination of fenitrothion and EPN using recombinant *Pseudomonas putida* JS444 with surface-expressed organophosphorous hydrolase. 2. Modified carbon paste electrode. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 136, n. 3, p.243–250, 2007.

LEI, Y.; MUCHANDANI, P.; WANG, J.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A.; Highly sensitive and selective amperometric microbial biosensor for direct determination of p-nitrophenyl-substituted organophosphate nerve agents. **Environmental science & technology**, v. 39, p.8853–8857, 2005.

LEI, Y., CHEN, W., MULCHANDANI, A., Microbial Biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 568, p.200–210, 2006.

LENS, P., VALLERO, M., POL, L.H. Sulfur cycle. In M. SCHAECHTER e J. LEDERBERG, eds. **The Desk Encyclopedia of Microbiology**. London, UK: Elsevier Academic Press, p. 974–983, 2004.

LERICHE, V., CARPENTIER, B. Viable but nonculturable Salmonella typhimurium in single and binary biofilms in response to chlorine treatment. **Journal of Food Protection**, v. 58, p.1186–1191, 1995.

LITTLE, B.J., WAGNER, P.A., LEWANDOWSKI, Z. The relationship between biomineralization and microbiologically influenced corrosion. **The British Phycological Society**. 1998.

LIU, S.; ZHU, Z.; FAN, C.; QIU, Y.; ZHAO, J. Seasonal variation effects on the formation of trihalomethane during chlorination of water from Yangtze River and associated cancer risk assessment. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 9, p.1503–1511, 2011.

LIU, Y., YANG, S.F., TAY, J.H. Improved stability of aerobic granules by selecting slow-growing nitrifying bacteria. **Journal of Biotechnology**, v. 108, p.161–169, 2004.

LÓPEZ-GALINDO, C.; GARRIDO, M. C.; CASANUEVA, J. F.; NEBOT, E. Science of the Total Environment Degradation models and ecotoxicity in marine waters of two antifouling compounds : Sodium hypochlorite and an alkylamine surfactant. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 8, p.1779–1785, 2010.

LORITE, G.S.; DE SOUZA, A.; NEUBAUER, D.; MIZAIKOFF, B.; KRANZ, C.; COTTA, M. On the role of extracellular polymeric substances during early stages of Xylella fastidiosa biofilm formation. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 102, p.519–25, 2013.

LU, L.; CHEE, G.; YAMADA, K.; JUN, S. Biosensors and Bioelectronics Electrochemical impedance spectroscopic technique with a functionalized microwire sensor for rapid detection of foodborne pathogens. **Biosensors and Bioelectronic**, v. 42, p.492–495, 2013.

MACIEL, C.L. **Estudos dos processos geoquímicos de obstrução defiltros de barragens**. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação do Instituto de Geociências, USP, São Paulo (SP), 1982.

MÄDER NETTO, O.S., **Controle da incrustação de organismos invasores em materiais de sistemas de resfriamento de usinas hidrelétricas**. Programa de Pós-Graduação em engenharia e Ciências dos Materiais – PIPE, Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR), 113p, 2011.

MAH, T.C., O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **TRENDS in Microbiology**, v. 9, p.34–39, 2001.

MAPELLI, V., OLSSON, L., NIELSEN, J. Metabolic footprinting in microbiology: methods and applications in functional genomics and biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 26, n. 9, p.490–497, 2008.

MARANGONI, P.R.D.; ROBL, D.; DALZOTO, P. R.; BERTON, M. A. C.; VICENTE, V. A.; PIMENTEL, I. C. Microbial Diversity of Biofilms on Metallic Surfaces in Natural Waters Case Study in a Hydropower Plant on Amazon Forest. **Journal of Water Resource and Hydraulic Engineering**, v. 2, n. 4, p.140–148, 2013a.

MARANGONI, P.R.D.; ROBL, D., BERTON, M. A. C.; GARCIA, C, M.; BOZZA, A.; PORSANI, M. V.; DALZOTO, P. R.; VICENTE, V. A.; PIMENTEL, I. C. Occurrence of Sulphate Reducing Bacteria ( SRB ) Associated with Biocorrosion on Metallic Surfaces in a Hydroelectric Power Station in Ibirama ( SC ) – Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 5, p.801–809, 2013b.

MARANGONI, P.R.D.; DALZOTO, P.R.; BERTON, M. A. C.; POITEVIN, C. G.; PIMENTEL, I. C. Pseudomonas aeruginosa adhesion and biofilm formation on platinum surface real-time monitoring by electrochemical impedance spectroscopy. **Revista Sodebras Soluções para o desenvolvimento do País**, v. 8, n. 94, p.121–126, 2013c.

MARANGONI, P.R.D.; BERTON, M.A.C.; PIMENTEL, I. C.; DALZOTO, P. R. Sistema em fluxo contínuo para monitoramento da formação de biofilme em substrato sólido por técnicas microscópicas e eletroquímicas. Centrais Elétricas do Norte do Brasil SA - Eletrobrás/Eletronorte, BR 10 2013 026485 7, 36p, 2013d.

MARSHALL, K.C., STOUT, R., MITCHELL, R., Mechanism of initial events in the adsorption of marine bacteria to surfaces. **Journal of General Microbiology**, v. 86, p.337–348, 1971.

MASOOD, A., DOGRA, J.V. V, JHA, A.K., The influence of colouring and pungent agents of red Chilli (Capsicum annum) on growth and aflatoxin production by Aspergillus flavus. **Lett. Appl. Microb.**, v. 18, p.184–186. 1994.

MATSUMOTO, S., TERADA, A., TSUNEDA, S., Modeling of membrane-aerated biofilm: effects of COD/tn ratio, biofilm thickness and surface loadin of oxygen on feasibility of simultaneous nitrification and denitrification. **Biochemistry Engineering Journal**, v. 37, p.98–107, 2007.

MCNEIL, M.B., LITTLE, B.J. Mackinawite formation during microbial corrosion. **Corrosion**, v. 46, p.599–600, 1990.

MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. **Microbiologia Ambiental**, Embrapa, 1997.

MENEZES, M., OLIVEIRA, S.M.A. **Fungos Fitopatogênicos**, Pernambuco: **UFRPE - Imprensa Universitária**, 1993.

MIKKELSEN, S.R., RECHNITZ, G.A. Conductometric transducers for enzymebased biosensors. **Analytical chemistry**, v. 61, p.1737–1742, 1989.

MIQUELETO, A.; DOLOSIC, C.; POZZI, E.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Influence of carbon sources and C/N ratio on EPS production in anaerobic sequencing batch reactors for wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v. 101, p.1324–1330, 2010.

MIRZAJANI, F.; ASKARI, H.; HAMZELOU, S.; SCHÖBER, Y.; RÖMPP, A.; GHASSEMPOUR, A.; SPENGLER, B. Ecotoxicology and Environmental Safety Proteomics study of silver nanoparticles toxicity on *Bacillus thuringiensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 100, p.122–130, 2014.

MITCHELL, A.C.; PHILLIPS, A. J.; HAMILTON, M. A.; GERLACH, R.; HOLLIS, W. K.; KASZUBA, J. P.; CUNNINGHAM, A. B. Resilience of planktonic and biofilm cultures to supercritical CO<sub>2</sub>. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p.318–325. 2008.

MITTELMAN, M.W. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operation. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p.2760–2764, 1998.

MOCANU, A.; FURTOS, G.; RAPUNTEAN, S.; HOROVITZ, O.; FLORE, C.; GARBO, C.; DANISTEANU, A.; RAPUNTEAN, G.; PREJMEREAN, C.; TOMOAI-COTISEL, M. Synthesis; characterization and antimicrobial effects of composites based on multi-substituted hydroxyapatite and silver nanoparticles. **Applied Surface Science**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.01.166>, 2014.

MOON, S.; ONUR, H.; OZCAN, A.; KHADEMHOSEINI, A.; HÆGGSTROM, E.; KURITZKES, D.; DEMIRCI, U. Integrating microfluidics and lensless imaging for point-of-care testing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p.3208–3214, 2009.

MORENTE, E.O.; FERNÁNDEZ-FUENTES, M. A.; JOSÉ, M.; BURGOS, G.; ABRIOUEL, H.; PULIDO, R. P.; GÁLVEZ, A. Biocide tolerance in bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, n. 1, p.13–25, 2013.

MULCHANDANI, P., CHEN, W., MULCHANDANI, A., Microbial biosensor for direct determination of nitrophenyl-substituted organophosphate nerve agents using genetically engineered *Moraxella* sp. **Analytica Chimica Acta**, v. 558, n. 1-2, p.217–221, 2006.

MULLIS, K.B., FALOONA, F.A. Recombinant DNA - Part F. In **A polymerase catalyzed chain reaction**. San Diego: **Academic Press**, p. 335–350, 1987.

MULVEY, M.A., HULTGREN, S.J. Adhesion, Bacterial. In M. SCHAECHTER e J. LEDERBERG, eds. **The Desk Encyclopedia of Microbiology**. London, UK: **Elsevier Academic Press**, p. 1–9, 2004.

MURRAY, P.R.; BARON, E. J.; TENOVER, M. A.; YOLKEN, F. C.; PFALLER, R. H. **Manual of Clinical Microbiology** 8<sup>a</sup> ed., Washington: **ASM Press**. 2003.

NACE, **Selection , Application , and Evaluation of Biocides in the Oil and Gas Industry**, 2006.

NCCLS, CLSI. Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15<sup>o</sup> Suplemento Informativo, 2005.

NCCLS, CLSI, Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão, 2003.

NEIVA, I.F., **Caracterização molecular de biosorotipos selvagens de streptococcus mutans isolados de crianças com diferentes históricos da doença cárie**. Universidade Federal do Paraná, 2007.

NIGAUD, Y.; COSETTE, P.; COLLET, A.; SONG, P. C.; VAUDRY, D.; VAUDRY, H.; JUNTER, G. A.; JOUENNE, T. Biofilm-induced modifications in the proteome of *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1804, n. 4, p.957–966, 2010.

PALACIOS, M., PAMPILLÓN, J.F., RPDRÍGUEZ, M.E. Organohalogenated compounds levels in chlorinated drinking waters and current compliance with quality standards throughout the European Union. **Water Research**, v. 34, n. 3, p.1002–1016, 2000.

PAREDES, J.; BECERRO, S.; ARIZTI, F.; AGUINAGA, A.; DEL POZO, J.L.; ARANA, S. Interdigitated microelectrode biosensor for bacterial biofilm growth monitoring by impedance spectroscopy technique in 96-well microtiter plates. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 178, p.663–670, 2013.

PARIZZI, S.Q.F., **Adesão bacteriana em superfície de serviços de alimentação hospitalar avaliada pela microscopia de epifluorescência**. Universidade Federal de Viçosa, 1998.

PERNI, S.; JORDAN, S. J.; ANDREW, P. W.; SHAMA, G. Biofilm development by *Listeria innocua* in turbulent flow regmes. **Food Control**, v. 17, p.875–883, 2006.

PIRES, L.; SACHSENHEIMER, K.; KLEINTSCHEK, T.; WALDBAUR, A.; SCHWARTZ, T.; RAPP, B. E. Online monitoring of biofilm growth and activity using a combined multi-channel impedimetric and amperometric sensor. **Biosensors & bioelectronics**, v. 47, p.157–63, 2013.

PRABHAKAR, J.; SENTHILKUMAR, M.; PRIYA, M. S.; MAHALAKSHMI, K.; SEHGAL, P. K.; SUKUMARAN, V. G. Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Herbal



Alternatives ( Triphala and Green Tea Polyphenols ), MTAD , and 5 % Sodium Hypochlorite against *Enterococcus faecalis* Biofilm Formed on Tooth Substrate : An In Vitro Study. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 1, p.83–86, 2010.

QUILÈS, F., HUMBERT, F., DELILLE, A. Analysis of changes in attenuated total reflection FTIR fingerprints of *Pseudomonas fluorescens* from planktonic state to nascent biofilm state. **Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 75, n. 2, p.610–616, 2010.

QUITELA, A. **Hidráulica**, Lisboa: **Fundação Gulbenkian**, 2007.

RADZIG, M.A.; NADTOCHENKO, V. A.; KOKSHAROVA, O. A.; KIWI, J.; LIPASOVA, V. A.; KHMEL, I. A. Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria : Influence on the growth and biofilms formation , mechanisms of action. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p.300–306, 2013.

RAMPIONI, G.; POLITICELLI, F.; BERTANI, I.; RIGHETTI, K.; VENTURI, V.; ZENNARO, E.; LEONI, L. The *Pseudomonas* quorum-sensing regulator RsaL belongs to the tetrahelical superclass of H-T-H proteins. **Journal of bacteriology**, v. 189, n. 5, p.1922–1930, 2007.

REDDY, A.S.G.; NARAKATHU, B. B.; ATASHBAR, M. Z.; REBROS, M.; REBROSOVA, E.; JOYCE, M. K. Gravure Printed Electrochemical Biosensor. **Procedia Engineering**, v. 25, p.956-959, 2011.

REIS JUNIOR, F.B., REIS, V.M., TEIXEIRA, K.R.S. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* sp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p.431–438, 2006.

RODRIGUEZ-CAVALLINI, E., CRUZ, E. Un método sencillo para generar anaerobiosis en tubos de cultivo. **Revista Biomédica**, v. 10, p.103–106, 1999.

ROGERS, K.R. Recent advances in biosensor techniques for environment monitoring. **Analytica Chimica Acta**, v. 568, p.222–231, 2006.

RÖSKE, K.; SACHSE, R.; SCHEERER, C.; RÖSKE, I. Microbial diversity and composition of the sediment in the drinking water reservoir Saidenbach (Saxonia, Germany). **Systematic and applied microbiology**, v. 35, n. 1, p.35–44, 2012.

RÖSKE, K., RÖSKE, I., UHLMANN, D. Characterization of the bacterial population and chemistry in the bottom sediment of a laterally subdivided drinking water reservoir system. **Limnologia - Ecology and Management of Inland Waters**, v. 38, n. 3-4, p.367–377, 2008.

RUMJANEK, N.G., FONSECA, M.C.C., XAVIER, G.R. Quorum sensing em sistemas agrícolas - comportamento multicelular em procarioto via comunicação intercelular. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p.35–50, 2004.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** **29**, v. 239, p.487–491, 1988.

SALVAREZZA, R.C., DE MELE, M.F., VIDELA, H.A. Study of the biological films formed during the pitting of aluminium in human plasma. **The journal of the European Society for Artificial Organs**, p.137–144, 1984.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning a Laboratory manual**, New York: **Cold Spring Harbor Lab. Press**, 2002.

SCHWEIZER, H.P. Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. **FEMS Microbiology Letters**, 202, p.1–7. 2001.

SHULGA, A.A.; SOLDATKIN, A. P.; ELSKAYA, A. V.; DZYADEVICH, S. V.; PATSKOVSKY, S. V.; STRIKHA, V. I. Thin-film conductometric biosensors for glucose and urea determination. **Biosensors & bioelectronics**, v. 9, n. 3, p.217–223, 1994.

SILVA, F. DE A.S. E., AZEVEDO, C.A.V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In World Congress on Computers in Agriculture. Reno-NV-USA: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; MACHADO, I.; PEREIRA, M. O.; VIEIRA, M. J. Control of flow-generated biofilms using surfactants - evidence of resistance and recovery. **Food and Bioproducts Processing**, v. 84, p.338–345, 2006.

SIMÕES, M., SIMÕES, L.C., VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p.573–583, 2010.

SIMÕES, M., VIEIRA, M.J. Persister cells in *Pseudomonas fluorescens* biofilms treated with a biocide. In Proceedings of International conference processes in biofilms: Fundamentals to applications. Davis, CA (USA), p. 58–62, 2009.

SIQUEIRA JR, J.F.; ROÇAS, I.N.; CARDOSO, C.C.; MACEDO, S.B.; LOPES, H.P. Efeitos antibacterianos de um novo medicamento - o óleo ozonizado - comparados às pastas de hidróxido de cálcio. **RBO**, p.1–5, 2000.

SIVARAMAN, S.; ZWAHLEN, J.; BELL, A. F.; HEDSTROM, L.; TONGE, P. J. Structure-activity studies of the inhibition of FabI, the enoyl reductase from *Escherichia coli*, by triclosan: kinetic analysis of mutant FabIs. **Biochemistry**, v. 42, p.4406–4413, 2003.

SMITH, J.L., FRATÂMICO, P.M., Factores involved in the emergence and persistence of foodborne diseases. **Journal of Food Protection**, v. 58, p.696–708, 1995.

SMITH, K.S.; DESOUZA, C.; MAYER, M.; SINGLETON, F. L. Biofilm Growth Device. US Patente WO 02/10434 A2, 2002.

SONDOSSI, M. Biocides (Nonpublic health, Nonagricultural antimicrobials). In M. SCHAECHTER e J. LEDERBERG, eds. **The Desk Encyclopedia of Microbiology**. London, UK: **Elsevier Academic Press**, p. 147–160, 2004.

SPOERING, A.L., GILMORE, M.S. Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p.133–137, 2006.

SRIYUTHA MURTHY, P.; VENKATESAN, R.; NAIR, K.V.K.; INBAKANDAN, D.; SYED JAHAN, S.; MAGESH PETER, D.; RAVINDRAN, M. Evaluation of sodium hypochlorite for fouling control in plate heat exchangers for seawater application. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 55, n. 3, p.161–170, 2005.

STEWART, P.S., COSTERTON, J.W., Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **Lancet**, v. 358, p.135–138, 2001.

STOODLEY, P., BEER, D., LAPPIN-SCOTT, H.M. Influence of electric Fields and PH on Biofilm Structure as Related to the Bioelectric Effect. **Antimicrob. Agents. Chemother**, p.1876–1879, 1997.

STRINGARI, D. **Estudo da variabilidade genética de Guinardia spp por meio de marcadores RAPD e sequências ITS**. Universidade Federal do Paraná, 2004.

SU, L.; JIA, W.; HOU, C.; LEI, Y. Microbial biosensors: a review. **Biosensors & bioelectronics**, v. 26, n. 5, p.1788–1799, 2011.

SURMAN, S., MORTON, G., KEEVIL, B., Biofilms: an overview. **PHLS Microbiology Digest**, v. 13, p.33–38, 1996.

TAKANASHI, H.; URANO, K.; HIRATA, M.; HANO, T.; OHGASKI, S. Method for measuring mutagen formation potential (MFP) on chlorination as a new water quality index. **Water Research**, v. 35, n. 7, p.1627–1634, 2001.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Likelihood, Distance, and Parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, 2011.

THANTSHA, M.S., CLOETE, T.E. The effect of sodium chloride and sodium bicarbonate derived anolytes, and anolyte-catholyte combination on biofilms. **Water SA**, v. 32, n 2, p.237–242, 2006.

THOMAS, C.J., EDYVEAN, R.G.J., BROOK, R. Biologically enhanced fatigue. **Biofouling**, v. 1, p.65–77, 1988.

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R.L., CASE, C. **Microbiologia**, 8ed., Porto Alegre: **Artmed**. 2005.

TURNER, A.P.F. Biosensors: sense and sensibility. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 8, p.3184–3196, 2013.

VICENTE, V.A. **Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose**. Universidade de São Paulo, 2000.

VIDELA, H.A. **Biocorrosão, Biofouling e Biodeterioração de Materiais** 1st ed., São Paulo: **E. Blucher**, 2003.

VIDELA, H.A., Prevention and control of biocorrosion. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 49, p.259–270, 2002.

VIEIRA, M.J., MELO, L., PINHEIRO, M.M. Biofilm formation: hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. **Biofouling**, v. 7, p.67–80, 1993.

WAGNER, V.E.; FRELINGER, J. G.; BARTH, R. K.; IGLEWSKI, B. H. Quorum sensing: dynamic response of *Pseudomonas aeruginosa* to external signals. **TRENDS in Microbiology**, v. 14, p.55–58, 2006.

WANG, J. Electrochemical glucose biosensors. **Chem Rev**, v. 108, p.814–825, 2008.

WARSCHEID, T., BRAAMS, J. Biodeterioration of stone : a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 46, p.343–368. 2000.

WATERS, C.M., BASSLER, B.L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 21, p.319–46, 2005.

WHITE, T.J., BRUNS, T., TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, ed. PCR protocols: a guide to methods and applications. London, UK: **Academic Press**, p. 315–322, 1990.

WHITEHEAD, N.A.; BARNARD, A. M. L.; SLATER, H.; SIMPSON, N. J. L.; SALMOND, G. P. C. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p.365–404, 2001.

WHITFIELD, C. Lipopolysaccharides. In M. SCHAECHTER e J. LEDERBERG, eds. **The Desk Encyclopedia of Microbiology**. London, UK: **Elsevier Academic Press**, p. 645–657, 2004.

WILLIAMS, P.; CAMARA, M.; HARDMAN, A.; SWIFT, S.; MILTON, D.; HOPE, V. J.; WINZER, K.; MIDDLETON, B.; PRITCHARD, D. I.; BYCROFT, B. W. Quorum sensing and the population dependent control of virulence. **Series B - Biological Sciences**, v. 355, p.667–680, 2000.

WILLIAMS, P., CÁMARA, M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, p.182–191, 2009.

WINTERMUTE, E.H., SILVER, P. A. Emergent cooperation in microbial metabolism. **Molecular systems biology**, v. 6, n. 407, pp 1-7, 2010.

WOODWARD, J.H., MNL17-2ND: Bactericides, Fungicides, and Algicides, In Paint and Coating Test Manual, **ASTM International**, 2012.

XUE, S.; WANG, K.; ZHAO, Q. L.; WEI, L. L. Chlorine reactivity and transformation of effluent dissolved organic fractions during chlorination. **Desalination**, v. 249, n. 1, p.63–71, 2009.

YAGI, K. Applications of Whole-Cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 73, p.1251–1258, 2007.

YANG, L. Electrical impedance spectroscopy for detection of bacterial cells in suspensions using interdigitated microelectrodes. **Talanta**, v. 74, n. 5, p.1621–1629. 2008.

YANG, L.; LI, Y.; GRIFFIS, C. L.; JOHNSON, M. G. Interdigitated microelectrode (IME) impedance sensor for the detection of viable *Salmonella typhimurium*. **Biosensor and Bioelectronics**, p.1139–1147, 2004.

YEBRA, D.M., KIIL, S., DAM-JOHANSEN, K. Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. **Progress in Organic Coatings**, v. 50, n. 2, p.75–104, 2004.

ZANGENBERG, G., SAIKI, R.K., REYNOLDS, R. Multiplex PCR : Optimization Guidelines. In: **PCR Applications: Protocols for functional Genomics**, Academic Press, 566p, 1999.

ZINKEVICH, V.; BOGDARINA, I.; KANG, H.; HILL, M. W.; TAPPER, R.; BEECH, I.B. Characterisation of exopolymers produced by different isolates of marine sulphate-reducing bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 37, n. 3-4, p.163–172, 1996.

## APENDICE A

Análise estatística das contagens de UFC/m<sup>2</sup> para bactérias aeróbias/anaeróbias facultativas, amostras coletadas de Estações de corrosão na UHE-Tucuruí, período 2011-2012.

=====

=====

ASSISTAT Versão 7.6 beta (2011) - Homepage <http://www.assistat.com>

Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.05/03/2012

=====

=====

Arquivo estat ANOVA e teste Tukey BAC Data 14/09/2012 Hora 08:28:44

### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	16	78.45325	4.90333	2.3554 *
Resíduo	44	91.59654	2.08174	
Total	60	170.04978		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
16	44	1.8789	2.3554	0.0126

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	6.77010 ab	nr = 3
2	7.16060 ab	nr = 3
3	7.50888 ab	nr = 6
4	7.34442 ab	nr = 6
5	7.44258 ab	nr = 6
6	7.94090 ab	nr = 3
7	7.84480 ab	nr = 3
8	8.11423 ab	nr = 3
9	3.93480 b	nr = 2
10	4.43725 ab	nr = 2
11	3.95505 b	nr = 2
12	7.22383 ab	nr = 6

13	7.41580 ab	nr = 4
14	7.85093 ab	nr = 3
15	7.40013 ab	nr = 3
16	8.32010 ab	nr = 3
17	8.89400 a	nr = 3

dms =  $5.29499 \times \text{RaizQuadrada}(1/\text{nr1} + 1/\text{nr2})$

Onde nr1 e nr2 são os números de

repetições de duas médias comparadas

nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 7.25120 CV% = 19.90  
Ponto médio = 4.70705

#### DADOS

6.7953	6.5735	6.9415
7.3172	6.9318	7.2328
7.4291	7.6778	7.2908
7.4484	7.7588	7.4484
6.8745	6.6984	6.9415
7.6278	7.8367	8.0876
7.4766	7.3751	7.5435
7.3974	7.3516	7.5113
7.7037	8.0928	8.0262
7.8648	7.8909	7.7787
8.2812	8.0562	8.0053
7.5686	.3010	
8.5735	.3010	
7.6091	.3010	
7.5724	7.0638	7.2059
7.1635	7.1852	7.1522
8.5090	7.2895	7.0359
6.8288	7.7883	7.8090
7.9555	7.4486	7.3588
7.3930	8.0732	8.4260
8.4611	8.5872	8.9817
9.1131		

#### SIGLAS E ABREVIACÕES

UFCG = Universidade Federal de Campina Grande

CTRN = Centro de Tecnologia e Recursos Naturais

DEAG = Departamento de Engenharia Agrícola

FV = Fonte de variação GL = Graus de liberdade

SQ = Soma de quadrado QM = Quadrado médio

F = Estatística do teste F MG = Média geral

CV% = Coeficiente de variação em %

dms = Diferença mínima significativa

#### REFERÊNCIAS DO ASSISTAT

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p.393-396.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.4,n.1, p71-78,2002.

Silva, F.de A.S.e. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6, Cancun, 1996. Anais... Cancun: American Society of Agricultural Engineers, 1996. p.294-298.

OBS: Estes resultados estão em fonte Courier New de tamanho = 12

## APENDICE B

Análise estatística das contagens de UFC/m<sup>2</sup> para Fungos, amostras coletadas de Estações de corrosão na UHE-Tucuruí, período 2011-2012.

```
=====
=====
ASSISTAT Versão 7.6 beta (2011) - Homepage http://www.assistat.com
Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.05/03/2012
=====
=====
Arquivo estat ANOVA e teste Tukey FUN Data 14/09/2012 Hora 08:34:13
```

### EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	16	75.15751	4.69734	2.9988 **
Resíduo	42	65.78899	1.56640	
Total	58	140.94650		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)  
 \* significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 <= p < .05)  
 ns não significativo (p >= .05)

GL	GLR	F-crit	F	p
16	42	2.4592	2.9988	0.0021

#### MÉDIAS E MEDIDAS

##### Médias de tratamento

1	7.09047 abc	nr = 3
2	7.30517 ab	nr = 3
3	6.30252 abc	nr = 5
4	6.44585 abc	nr = 2
5	6.27700 abc	nr = 5
6	5.56380 abc	nr = 2
7	3.51465 bc	nr = 2
8	5.99815 abc	nr = 2
9	3.08535 c	nr = 2
10	3.17580 bc	nr = 2
11	6.31920 abc	nr = 3
12	6.69950 abc	nr = 4
13	7.50224 a	nr = 5
14	6.76858 abc	nr = 5
15	6.94792 abc	nr = 6
16	6.88216 abc	nr = 5

17 6.55300 abc nr = 3

dms = 4.60573 x RaizQuadr(1/nr1 + 1/nr2)

Onde nr1 e nr2 são os números de repetições de duas médias comparadas  
 nr = número de repetições do tratamento

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 6.34777 CV% = 19.72  
 Ponto médio = 4.35350

#### DADOS

7.7776	6.0964	7.3974
7.3172	7.3655	7.2328
6.0867	6.5638	6.3877 6.0867 6.3877
6.0964	6.7953	
6.0964	6.3974	6.0964 6.6984 6.0964
5.5638	5.5638	
6.7283	.3010	
5.6091	6.3872	
5.8697	.3010	
6.0506	.3010	
6.7852	6.0862	6.0862
5.5724	6.6863	6.4755 8.0638
6.8522	7.1533	7.4123 8.4060 7.6874
6.7496	6.8957	6.5735 7.0506 6.5735
6.8957	6.6527	6.2725 6.8745 7.2725 7.7196
6.6527	5.5735	7.0206 6.8745 8.2895
7.0649	6.4186	6.1755

#### SIGLAS E ABREVIACÕES

UFCG = Universidade Federal de Campina Grande  
 CTRN = Centro de Tecnologia e Recursos Naturais  
 DEAG = Departamento de Engenharia Agrícola  
 FV = Fonte de variação GL = Graus de liberdade  
 SQ = Soma de quadrado QM = Quadrado médio  
 F = Estatística do teste F MG = Média geral  
 CV% = Coeficiente de variação em %  
 dms = Diferença mínima significativa



## REFERÊNCIAS DO ASSISTAT

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p.393-396.

Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.4,n.1, p71-78,2002.

Silva, F. de A. S. e. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6, Cancun, 1996. Anais... Cancun: American Society of Agricultural Engineers, 1996. p.294-298.

OBS: Estes resultados estão em fonte Courier New de tamanho = 12

## APENDICE C

### Análise Fatorial e teste de Scott-Knot para análise da atividade antimicrobiana de biocidas químicos e de fontes naturais em Meio sólido

=====

ASSISTAT Versão 7.6 beta (2013) - Homepage  
http://www.assistat.com  
Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG -  
Atualiz.13/05/2013

=====

Arquivo Estat Fatorial e Scott-Knot Biocidas em meio sólido  
Data 09/06/2013 Hora 13:00:15

#### EXPERIMENTO FATORIAL

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
Fator1(F1)	13	5626.44898	432.80377	1510.3182
**				
Fator2(F2)	27	19164.85374	709.80940	2476.9610
**				
Int. F1xF2	351	2696.40816	7.68207	26.8075 **
Tratamentos	391	27487.71088	70.30105	
245.3235 **				
Resíduo	784	224.66667	0.28656	
Total	1175	27712.37755		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
13	784	2.1343	1510.318	<0.001
27	784	1.7444	2476.961	<0.001
351	784	1.0979	26.8075	<0.001
391	784	1.0855	245.3235	<0.001

Fator 1 = Bactérias

Fator 2 = Biocidas

#### MÉDIAS E MEDIDAS

#### Médias do fator 1

1	13.59524	h
2	14.69048	e
3	13.50000	h
4	13.50000	h
5	13.07143	i
6	13.03571	i
7	13.94048	g
8	15.59524	d
9	14.15476	f
10	15.84524	c

11	15.57143	d
12	18.61905	b
13	18.51190	b
14	20.01190	a

#### Médias do fator 2

1	16.59524	f
2	19.97619	d
3	21.11905	c
4	12.78571	j
5	14.35714	h
6	21.23810	c
7	22.23810	b
8	12.14286	l
9	13.16667	j
10	12.73810	j
11	13.19048	j
12	13.69048	i
13	15.14286	g
14	20.83333	c
15	22.69048	a
16	10.64286	m
17	15.54762	g
18	9.61905	n
19	10.23810	m
20	9.59524	n
21	11.04762	m
22	15.35714	g
23	16.50000	f
24	11.95238	l
25	13.64286	i
26	12.47619	l
27	17.38095	e
28	21.38095	c

#### MÉDIAS DE INTERAÇÃO

#### Fator 1 x Fator 2 (AxB)

A	B				
	B1	B2	B3	B4	B5
A1	13.3333 gG	16.3333 gE	17.3333 gD	11.6667 cH	12.3333 eH
A2	15.6667 eE	19.6667 dC	20.6667 dB	12.6667 cG	13.6667 dG
A3	12.6667 gE	18.6667 eC	19.6667 eC	10.3333 dG	11.3333 eF
A4	14.6667 fE	17.6667 fC	19.6667 eB	11.3333 dH	12.3333 eG
A5	14.3333 fE	16.0000 gD	17.3333 gC	10.3333 dI	12.0000 eG

A6 13.0000 gE 16.6667 gC 18.6667 fA 10.6667 dG  
12.3333 eE  
A7 16.6667 dB 17.0000 fB 17.6667 gB 12.3333 cF  
13.6667 dE  
A8 17.0000 dE 18.6667 eD 19.6667 eC 14.3333 bG  
16.0000 bF  
A9 14.6667 fE 18.3333 eC 18.6667 fC 12.3333 cG  
13.6667 dF  
A10 16.6667 dD 21.3333 cC 22.6667 cB 13.0000 cG  
14.6667 cF  
A11 19.3333 cB 19.3333 dB 19.6667 eB 13.6667 bF  
16.0000 bE  
A12 19.0000 cF 27.6667 aE 28.6667 aD 14.3333 bI  
16.0000 bH  
A13 20.6667 bD 26.3333 bC 28.0000 aB 15.6667 aG  
16.6667 bF  
A14 24.6667 aD 26.0000 bC 27.3333 bB 16.3333 aH  
20.3333 aF

Continuação					
Fator 1 x Fator 2 (AxB)					
B					
A	B6	B7	B8	B9	B10
A1	17.6667 fD	18.6667 fC	10.3333 fI	12.3333 dH	12.0000 cH
A2	21.0000 dB	21.6667 dA	11.3333 eH	12.6667 dG	12.3333 cG
A3	19.3333 eC	20.3333 eB	9.6667 fH	10.6667 eG	10.0000 dH
A4	19.3333 eB	20.6667 dA	10.3333 fH	11.0000 eH	10.6667 dH
A5	18.0000 fC	18.6667 fB	11.3333 eH	10.6667 eI	10.3333 dI
A6	18.3333 fB	19.0000 fA	10.3333 fG	10.6667 eG	10.0000 dG
A7	17.3333 fB	18.3333 fA	12.0000 dF	12.6667 dF	12.3333 cF
A8	20.3333 dB	21.6667 dA	13.3333 cH	15.0000 bG	14.3333 bG
A9	19.0000 eC	19.6667 eB	11.3333 eH	12.6667 dG	12.3333 cG
A10	22.3333 cB	23.6667 cA	12.3333 dH	13.6667 cG	13.3333 bG
A11	20.3333 dA	21.3333 dA	13.3333 cG	14.3333 bF	14.0000 bF
A12	29.0000 aD	30.6667 aC	14.0000 cI	14.6667 bI	14.3333 bI
A13	27.6667 bB	28.6667 bA	14.6667 bH	16.3333 aG	16.0000 aG
A14	27.6667 bB	28.3333 bA	15.6667 aH	17.0000 aG	16.3333 aH

Continuação					
Fator 1 x Fator 2 (AxB)					
B					
A	B11	B12	B13	B14	B15
A1	12.3333 cH	13.3333 eG	13.6667 eG	17.0000 fD	21.6667 dB
A2	12.3333 cG	12.6667 eG	14.0000 eF	20.6667 dB	22.3333 cA

A3 10.6667 dG 11.3333 fF 12.6667 fE 19.3333 eC  
21.3333 dA  
A4 11.0000 dH 11.3333 fH 12.6667 fG 18.6667 eB  
20.6667 eA  
A5 10.6667 dI 11.3333 fH 13.3333 fF 17.6667 fC  
19.6667 fA  
A6 10.3333 dG 11.3333 fF 12.0000 fF 17.6667 fB  
19.3333 fA  
A7 12.6667 cF 13.6667 eE 14.6667 dD 18.6667 eA  
19.0000 fA  
A8 14.6667 bG 14.3333 dG 16.3333 cF 19.3333 eC  
20.3333 eB  
A9 12.6667 cG 13.3333 eG 14.6667 dE 19.6667 eB  
21.3333 dA  
A10 14.3333 bF 14.3333 dF 15.3333 dF 21.6667 cC  
22.3333 cB  
A11 14.3333 bF 15.0000 cF 16.3333 cE 19.0000 eC  
20.6667 eA  
A12 14.6667 bI 15.3333 cI 17.3333 bG 28.3333 aD  
31.6667 aB  
A13 16.6667 aF 16.3333 bG 17.3333 bF 26.6667 bC  
29.0000 bA  
A14 17.3333 aG 18.0000 aG 21.6667 aE 27.3333 bB  
28.3333 bA

Continuação					
Fator 1 x Fator 2 (AxB)					
B					
A	B16	B17	B18	B19	B20
A1	9.3333 cI	14.3333 cF	8.0000 dJ	8.6667 dJ	8.3333 dJ
A2	10.6667 bI	14.6667 cF	9.3333 cJ	9.6667 cJ	9.0000 cJ
A3	9.0000 cI	13.3333 dE	8.3333 dI	9.3333 dH	9.0000 cI
A4	9.3333 cI	13.6667 dF	8.0000 dJ	8.6667 dJ	9.3333 cI
A5	10.0000 bI	14.0000 dE	10.3333 bI	9.6667 cI	9.6667 cI
A6	9.3333 cH	12.6667 eE	8.6667 dH	9.3333 dH	8.3333 dH
A7	10.3333 bG	15.3333 cD	9.3333 cG	9.6667 cG	9.6667 cG
A8	10.6667 bI	17.3333 bE	9.6667 cJ	10.3333 cI	9.3333 cJ
A9	9.6667 cI	15.0000 cE	8.3333 dJ	9.3333 dI	9.3333 cI
A10	10.6667 bJ	16.0000 bE	11.0000 aJ	11.6667 bI	10.3333 bJ
A11	10.6667 bI	16.6667 bE	9.3333 cJ	10.3333 cI	8.3333 dI
A12	12.6667 aL	16.6667 bH	11.3333 aM	12.3333 aL	11.6667 aM
A13	13.6667 aH	16.6667 bF	11.3333 aJ	11.6667 bJ	10.6667 bJ
A14	13.0000 aJ	21.3333 aE	11.6667 aL	12.6667 aJ	11.3333 aL

Continuação					
Fator 1 x Fator 2 (AxB)					
B					
A	B21	B22	B23	B24	B25

A1 10.0000 cI 13.0000 eG 14.3333 dF 11.6667 cH  
 13.3333 dG  
 A2 10.6667 cI 14.6667 dF 15.6667 cE 11.6667 cH  
 13.0000 dG  
 A3 11.6667 bF 12.6667 eE 13.6667 eD 13.0000 bE  
 14.3333 cD  
 A4 9.6667 dI 13.6667 eF 14.6667 dE 10.6667 dH  
 11.6667 eH  
 A5 10.3333 cI 12.3333 eG 13.3333 eF 11.6667 cH  
 13.3333 dF  
 A6 9.0000 dH 13.0000 eE 14.6667 dD 12.6667 bE  
 12.3333 eE  
 A7 10.3333 cG 14.6667 dD 15.6667 cC 10.0000 eG  
 12.6667 eF  
 A8 10.6667 cI 17.6667 bD 18.3333 bD 9.3333 eJ  
 14.3333 cG  
 A9 11.6667 bH 14.6667 dE 16.0000 cD 11.0000 dH  
 12.3333 eG  
 A10 11.6667 bI 15.6667 cE 16.6667 cD 12.3333 bH  
 13.6667 dG  
 A11 11.6667 bH 17.3333 bD 18.3333 bC 12.6667 bG  
 13.0000 dG  
 A12 12.6667 aL 16.6667 bH 17.6667 bG 13.6667 aJ  
 14.6667 cI  
 A13 11.6667 bJ 17.6667 bF 18.3333 bE 12.6667 bI  
 15.6667 bG  
 A14 13.0000 aJ 21.3333 aE 23.6667 aD 14.3333 aI  
 16.6667 aH

18 19 19  
 10 11 10  
 12 13 12  
 12 12 12  
 12 13 12  
 13 13 14  
 14 13 14  
 17 17 17  
 21 22 22  
 10 9 9  
 14 15 14  
 8 8 8  
 9 8 9  
 8 9 8  
 10 10 10  
 13 13 13  
 14 15 14  
 12 12 11  
 14 13 13  
 11 11 12  
 15 15 15  
 24 23 23  
 16 16 15  
 20 20 19  
 21 20 21  
 13 12 13  
 14 14 13  
 21 21 21  
 21 22 22

Continuação			
Fator 1 x Fator 2 (AxB)			
-----			
		B	
A	-----		
	B26	B27	B28
-----			
A1	11.3333 dH	15.0000 eF	23.3333 cA
A2	12.6667 cG	16.6667 cD	19.6667 eC
A3	11.0000 dG	14.3333 eD	20.3333 eB
A4	11.3333 dH	15.6667 dD	19.6667 eB
A5	11.6667 dH	15.6667 dD	12.3333 iG
A6	10.6667 dG	15.3333 dD	18.6667 fA
A7	12.3333 cF	16.3333 cC	15.3333 hD
A8	13.3333 bH	18.6667 bD	21.6667 dA
A9	11.6667 dH	16.6667 cD	16.3333 gD
A10	11.6667 dI	17.3333 cD	23.3333 cA
A11	12.6667 cG	19.6667 bB	18.6667 fC
A12	13.6667 bJ	18.6667 bF	33.3333 aA
A13	14.3333 bH	19.0000 bE	28.3333 bB
A14	16.3333 aH	24.3333 aD	28.3333 bA
-----			
Colunas - letras minúsculas		Linhas - letras maiúsculas	
As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade			
MG = 15.26020		CV% = 3.51	
Ponto médio = 21.00000			
DADOS			
-----			
13 14 13			
16 16 17			
17 18 17			
12 11 12			
12 13 12			
17 18 18			

11 12 11  
 13 13 12  
 13 12 12  
 12 12 13  
 13 12 13  
 14 14 14  
 21 20 21  
 22 23 22  
 11 10 11  
 14 15 15  
 9 10 9  
 9 10 10  
 9 9 9  
 11 10 11  
 15 14 15  
 15 16 16  
 11 12 12  
 13 13 13  
 13 12 13  
 17 16 17  
 19 19 21  
 13 13 12  
 19 18 19  
 19 20 20  
 10 10 11  
 11 12 11  
 19 19 20  
 20 21 20  
 10 10 9  
 11 10 11  
 10 10 10  
 10 11 11  
 12 11 11  
 12 13 13  
 19 20 19  
 21 21 22  
 9 9 9  
 13 14 13  
 9 8 8  
 9 9 10

9 9 9	12 12 13
11 12 12	18 18 19
13 12 13	19 19 19
14 14 13	10 10 11
13 13 13	10 11 11
15 14 14	10 10 10
11 11 11	11 10 10
14 14 15	11 12 11
20 21 20	12 12 12
15 14 15	18 18 17
18 18 17	19 20 19
20 20 19	9 10 9
11 11 12	13 13 12
13 12 12	9 8 9
19 20 19	9 10 9
21 20 21	9 8 8
11 10 10	9 9 9
11 11 11	13 13 13
11 10 11	15 14 15
11 11 11	13 13 12
11 12 11	13 12 12
13 12 13	11 10 11
18 19 19	15 16 15
21 21 20	18 19 19
9 10 9	17 17 16
13 14 14	17 17 17
8 8 8	18 17 18
9 8 9	12 12 13
9 9 10	14 13 14
10 9 10	17 17 18
13 14 14	19 18 18
15 14 15	12 12 12
10 11 11	13 12 13
12 11 12	13 12 12
11 11 12	13 12 13
15 16 16	13 14 14
19 20 20	15 14 15
14 15 14	19 18 19
16 16 16	19 19 19
18 17 17	11 10 10
10 11 10	15 16 15
12 12 12	9 9 10
18 18 18	9 10 10
19 18 19	9 10 10
11 11 12	11 10 10
10 11 11	15 15 14
10 10 11	16 15 16
10 11 11	10 10 10
11 12 11	13 13 12
13 13 14	12 13 12
18 17 18	16 16 17
19 20 20	16 15 15
10 10 10	17 17 17
14 14 14	18 19 19
10 11 10	20 19 20
10 9 10	15 14 14
10 10 9	16 16 16
10 10 11	20 21 20
12 13 12	21 22 22
14 13 13	13 14 13
12 12 11	15 15 15
13 13 14	15 14 14
12 11 12	15 15 14
16 15 16	15 14 14
12 12 13	16 16 17
13 13 13	20 19 19
16 17 17	21 19 21
18 19 19	11 11 10
10 11 11	17 18 17

10 9 10	20 20 19
10 11 10	14 14 13
10 9 9	16 16 16
10 11 11	20 20 21
18 17 18	21 22 21
18 19 18	13 14 13
10 9 9	14 14 15
14 14 15	14 14 14
13 13 14	14 15 14
18 19 19	15 15 15
22 22 21	16 16 17
15 14 15	19 19 19
18 18 19	21 20 21
19 18 19	11 11 10
12 13 12	16 17 17
14 14 13	9 9 10
19 19 19	11 10 10
19 20 20	9 8 8
12 11 11	11 12 12
13 13 12	18 17 17
13 12 12	18 19 18
13 13 12	12 13 13
13 13 14	13 13 13
15 14 15	13 12 13
20 20 19	20 19 20
22 21 21	18 19 19
10 10 9	19 19 19
15 15 15	28 28 27
8 8 9	28 29 29
10 9 9	15 14 14
10 9 9	16 16 16
11 12 12	29 29 29
15 14 15	31 31 30
16 16 16	14 14 14
11 11 11	15 15 14
12 13 12	14 15 14
12 11 12	14 15 15
16 17 17	15 16 15
16 16 17	17 17 18
17 17 16	28 29 28
21 21 22	32 32 31
23 23 22	13 13 12
13 13 13	17 17 16
15 14 15	11 11 12
23 22 22	12 13 12
23 24 24	11 12 12
13 12 12	12 13 13
14 13 14	16 17 17
14 13 13	17 18 18
14 15 14	14 13 14
14 14 15	14 15 15
15 15 16	14 13 14
22 21 22	19 19 18
23 22 22	33 33 34
10 11 11	21 21 20
16 16 16	26 26 27
11 11 11	28 28 28
11 12 12	15 16 16
11 10 10	17 16 17
11 12 12	28 27 28
15 16 16	28 29 29
17 16 17	15 14 15
13 12 12	17 16 16
14 13 14	16 16 16
11 12 12	16 17 17
17 18 17	16 17 16
23 23 24	17 17 18
19 19 20	26 27 27
19 20 19	29 29 29

14 14 13  
 17 17 16  
 11 11 12  
 12 11 12  
 11 11 10  
 12 11 12  
 17 18 18  
 19 18 18  
 12 13 13  
 16 16 15  
 15 14 14  
 19 19 19  
 28 29 28  
 24 25 25  
 26 26 26  
 28 27 27  
 16 16 17  
 20 20 21  
 28 28 27  
 28 28 29  
 15 16 16  
 17 17 17  
 17 16 16  
 17 18 17  
 18 18 18  
 22 21 22  
 27 28 27  
 28 28 29  
 13 13 13  
 21 21 22  
 12 11 12  
 12 13 13  
 12 11 11  
 13 13 13  
 22 21 21  
 24 23 24  
 14 14 15  
 17 16 17  
 17 16 16  
 24 25 24  
 29 28 28  
 -----

#### SIGLAS E ABREVIACÕES

UFMG = Universidade Federal de Campina Grande  
 CTRN = Centro de Tecnologia e Recursos Naturais  
 DEAG = Departamento de Engenharia Agrícola  
 FV = Fonte de variação GL = Graus de liberdade  
 SQ = Soma de quadrado QM = Quadrado médio  
 F = Estatística do teste F MG = Média geral  
 CV% = Coeficiente de variação em %

#### REFERÊNCIAS DO ASSISTAT

- Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.
- Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p.393-396.
- Silva, F. de A. S. e. & Azevedo, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.4,n.1, p.71-78,2002.
- Silva, F.de A.S.e. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6, Cancun, 1996. Anais... Cancun: American Society of Agricultural Engineers, 1996. p.294-298.

## APENDICE D

### Análise Fatorial e teste de Tukey para análise da atividade antimicrobiana de biocidas químicos e de fontes naturais em Meio Líquido.

=====

=====

ASSISTAT Versão 7.6 beta (2012) - Homepage <http://www.assistat.com>

Por Francisco de A. S. e Silva DEAG-CTRN-UFCG - Atualiz.14/12/2012

=====

=====

Biocidas Meio Líquido Data 03/03/2013 Hora 15:44:11

#### EXPERIMENTO FATORIAL

#### QUADRO DE ANÁLISE

FV	GL	SQ	QM	F
-----				
Fator1(F1)	2	10.25727	5.12864	1418.3349 **
Fator2(F2)	2	13.69265	6.84632	1893.3654 **
Fator3(F3)	27	71.30138	2.64079	730.3166 **
Int. F1xF2	4	1.65200	0.41300	114.2160 **
Int. F1xF3	54	15.46504	0.28639	79.2017 **
Int. F2xF3	54	4.48427	0.08304	22.9655 **
Int.F1x2x3	108	1.87645	0.01737	4.8050 **
-----				
Tratamentos	251	118.72906	0.47302	130.8158 **
Resíduo	504	1.82244	0.00362	
-----				
Total	755	120.55151		
-----				

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

GL	GLR	F-crit	F	p
2	504	4.6296	1418.335	<0.001
2	504	4.6296	1893.365	<0.001
4	504	3.3407	114.216	<0.001
27	504	1.7601	730.3166	<0.001
54	504	1.5237	79.2017	<0.001
54	504	1.5237	22.9655	<0.001
108	504	1.3687	4.805	<0.001
251	504	1.1762	130.8158	<0.001

Fator 1 = Bactéria

Fator 2 = Meio de Cultivo

Fator 3 = Biocida

#### MÉDIAS E MEDIDAS

#### Médias do fator 1

1	8.32327	c
2	8.60858	a
3	8.46684	b

dms = 0.01260

#### Médias do fator 2

1	8.35459	c
2	8.38856	b
3	8.65554	a

dms = 0.01260

#### Médias do fator 3

1	8.31467	jl
2	8.08704	n
3	7.99367	o
4	8.56285	ef
5	8.41023	hi
6	8.03298	no
7	7.98078	op
8	8.60621	de
9	8.52771	fg
10	8.55406	efg
11	8.53965	fg
12	8.50034	g
13	8.37222	ij
14	8.09166	n
15	7.92244	p
16	8.75781	c
17	8.33697	jl
18	8.92822	b
19	8.88671	b
20	8.89775	b
21	8.80269	c
22	8.43394	h
23	8.29445	l



24	8.78197	c			
25	8.57749	def			
26	8.62446	d			
27	8.21313	m			
28	9.02238	a			
-----					
dms =	0.06096				
MÉDIAS DE INTERAÇÃO					
Fator 1 x Fator 2 (AxB)					
-----					
	B				
A	-----				
	B1	B2	B3		
-----					
A1	8.2584 cC	8.2918 cB	8.4195 cA		
A2	8.4680 aC	8.5057 aB	8.8520 aA		
A3	8.3373 bC	8.3681 bB	8.6951 bA		
-----					
dms para colunas =	0.0218	dms para linhas =	0.0218		
Classific.c/letras minúsculas    Classific.c/letras maiúsculas					
Fator 1 x Fator 3 (AxC)					
-----					
	C				
A	-----				
	C1	C2	C3	C4	
-----					
A1	8.3224 bFG	8.1494 aH	7.9656 aJL	8.6323 aB	
A2	8.1841 cL	8.0939 aLMN	8.0298 aNO	8.6025 aEFGH	
A3	8.4375 aGHIJ	8.0178 bMN	7.9856 aMN	8.4537 bFGHI	
-----					
Continuação					
Fator 1 x Fator 3 (AxC)					
-----					
	C				
A	-----				
	C5	C6	C7	C8	
-----					
A1	8.3481 bFG	7.9930 aIJL	7.9033 bL	8.6140 abBC	
A2	8.5370 aHIJ	8.0591 aMN	8.0288 aNO	8.6556 aEFG	
A3	8.3456 bJL	8.0469 aM	8.0102 aMN	8.5490 bEF	
-----					
Continuação					
Fator 1 x Fator 3 (AxC)					
-----					
	C				
A	-----				
	C9	C10	C11	C12	
-----					

A1	8.5272 bBCD	8.4588 cDE	8.4089 cEF	8.3662 cEFG	
A2	8.5955 aFGH	8.6558 aEFG	8.6733 aEF	8.6113 aEFGH	
A3	8.4605 cFGHI	8.5476 bEF	8.5367 bEFG	8.5235 bEFGH	
-----					
Continuação					
Fator 1 x Fator 3 (AxC)					
-----					
	C				
A	-----				
	C13	C14	C15	C16	
-----					
A1	8.2689 cG	8.0825 abHI	7.9092 aL	8.4022 bEF	
A2	8.4600 aIJ	8.1474 aLM	7.9398 aO	8.9210 aCD	
A3	8.3878 bIJL	8.0450 bM	7.9183 aN	8.9502 aC	
-----					
Continuação					
Fator 1 x Fator 3 (AxC)					
-----					
	C				
A	-----				
	C17	C18	C19	C20	
-----					
A1	8.0780 bHI	8.5802 bBC	8.5253 bCD	8.6019 bBC	
A2	8.4356 aJ	9.1111 aAB	9.0573 aAB	9.0491 aB	
A3	8.4973 aEFGH	9.0933 aAB	9.0775 aAB	9.0423 aABC	
-----					
Continuação					
Fator 1 x Fator 3 (AxC)					
-----					
	C				
A	-----				
	C21	C22	C23	C24	
-----					
A1	8.3745 bEF	8.0550 cHIJ	8.0415 bIJ	8.7602 bA	
A2	9.0229 aBC	8.9237 aCD	8.9246 aCD	8.8749 aD	
A3	9.0107 aBC	8.3231 bL	7.9173 cN	8.7108 bD	
-----					
Continuação					
Fator 1 x Fator 3 (AxC)					
-----					
	C				
A	-----				
	C25	C26	C27	C28	
-----					
A1	8.4544 cDE	8.4198 bEF	8.0418 bIJ	8.7668 bA	
A2	8.7032 aE	9.0256 aBC	8.5551 aGHI	9.1624 aA	
A3	8.5748 bE	8.4280 bHIJL	8.0425 bM	9.1379 aA	
-----					
dms para colunas =	0.0667	dms para linhas =	0.1056		

Classific.c/letras minúsculas    Classific.c/letras maiúsculas

Fator 2 x Fator 3 (BxC)				
C				
B	C1	C2	C3	C4
B1	8.2591 bHIJ	7.9420 bN	7.8877 bN	8.4274 bDE
B2	8.2821 bIJ	7.9546 bN	7.8894 bN	8.4772 bEF
B3	8.4029 aIJ	8.3645 aIJ	8.2038 aL	8.7840 aFG

Continuação				
Fator 2 x Fator 3 (BxC)				
C				
B	C5	C6	C7	C8
B1	8.2559 bIJ	7.8904 bN	7.8915 bN	8.4412 bDE
B2	8.2740 bJL	7.8930 bN	7.8898 bN	8.4833 bEF
B3	8.7009 aG	8.3155 aJ	8.1611 aLM	8.8941 aCDE

Continuação				
Fator 2 x Fator 3 (BxC)				
C				
B	C9	C10	C11	C12
B1	8.3665 bEFG	8.3643 bEFGH	8.3579 bEFGHI	8.3209 bFGHIJ
B2	8.4027 bFGH	8.3961 bFGH	8.4018 bFGH	8.3501 bGHIJ
B3	8.8139 aDEF	8.9018 aCD	8.8592 aCDEF	8.8299 aDEF

Continuação				
Fator 2 x Fator 3 (BxC)				
C				
B	C13	C14	C15	C16
B1	8.1493 bLM	8.0949 aM	7.8959 bN	8.6728 bC
B2	8.1734 bLM	8.1135 aM	7.9046 abN	8.7252 bD
B3	8.7940 aEFG	8.0667 aMN	7.9668 aN	8.8754 aCDEF

Continuação				
Fator 2 x Fator 3 (BxC)				
C				

B	C17	C18	C19	C20
B1	8.2787 bGHIJ	8.8244 cB	8.7911 bB	8.8163 bB
B2	8.3103 bHIJ	8.8911 bB	8.8521 bBC	8.8533 bBC
B3	8.4219 aI	9.0692 aAB	9.0170 aAB	9.0237 aAB

Continuação				
Fator 2 x Fator 3 (BxC)				
C				
B	C21	C22	C23	C24
B1	8.7250 bBC	8.3495 bEFGHI	8.2278 bJL	8.6700 bC
B2	8.7761 bCD	8.3860 bFGHI	8.3010 aHIJ	8.7113 bD
B3	8.9070 aCD	8.5664 aH	8.3545 aIJ	8.9646 aBC

Continuação				
Fator 2 x Fator 3 (BxC)				
C				
B	C25	C26	C27	C28
B1	8.4115 bDEF	8.5100 bD	8.1494 bLM	8.9572 bA
B2	8.4329 bFG	8.5698 bE	8.1763 bLM	9.0089 bA
B3	8.8881 aCDEF	8.7936 aEFG	8.3137 aJ	9.1011 aA

dms para colunas =    0.0667    dms para linhas =    0.1056  
Classific.c/letras minúsculas    Classific.c/letras maiúsculas

Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)			
BxC			
A	B1C1	B1C2	B1C3
A1	8.3040 a	8.0521 a	7.8894 a
A2	8.1581 b	7.8869 b	7.8869 a
A3	8.3152 aNOPQ	7.8869 b	7.8869 a

Continuação			
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)			
BxC			
A	B1C4	B1C5	B1C6
A1	8.5321 aFGHIJLMNOP	8.1677 b	7.8894 a

A2	8.4034 b	8.3431 a	7.8904 a
A3	8.3466 bLMNOPQ	8.2569 abPQ	7.8915 a

Continuação

Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

BxC			
A	B1C7	B1C8	B1C9

A1	7.8869 a	8.5427 aEFGHIJLMNO	8.5047 aGHIJLMNOPQ
A2	7.8904 a	8.4292 ab	8.3704 b
A3	7.8970 a	8.3517 bLMNOPQ	8.2245 cQ

Continuação

Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

BxC			
A	B1C10	B1C11	B1C12

A1	8.3334 bPQ	8.2888 b	8.2625 b
A2	8.4556 a	8.4763 a	8.4018 a
A3	8.3040 bPQ	8.3086 bOPQ	8.2984 abPQ

Continuação

Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

BxC			
A	B1C13	B1C14	B1C15

A1	8.1570 a	8.0734 a	7.8986 a
A2	8.1854 a	8.1611 a	7.8904 a
A3	8.1053 a	8.0501 a	7.8986 a

Continuação

Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

BxC			
A	B1C16	B1C17	B1C18

A1	8.3679 bMNOPQ	8.0602 b	8.4414 bJLMNOPQ
A2	8.8119 aJLMNO	8.3542 a	9.0202 aCDEFGHIJ
A3	8.8387 aFG	8.4216 aJLMNOPQ	9.0116 aBCDEF

Continuação

Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

BxC			
A	B1C19	B1C20	B1C21

A1	8.4409 bJLMNOPQ	8.5579 bCDEFGHIJLM	8.3390 bOPQ
A2	8.9462 aEFGHIJLMN	8.9492 aEFGHIJLMN	8.9244 aGHIJLMNO
A3	8.9862 aCDEF	8.9416 aDEF	8.9117 aDEF

Continuação

Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

BxC			
A	B1C22	B1C23	B1C24

A1	8.0156 c	7.9959 b	8.7581 aABCD
A2	8.8266 aJLMNO	8.7728 aMNOP	8.7364 aOPQ
A3	8.2062 b	7.9148 b	8.5154 bHIJLMNO

Continuação

Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

BxC			
A	B1C25	B1C26	B1C27

A1	8.4089 abLMNOPQ	8.3045 b	8.0004 b
A2	8.5017 a	8.9274 aGHIJLMNO	8.4470 a
A3	8.3238 bMNOPQ	8.2979 bPQ	8.0009 b

Continuação

Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

BxC			
A	B1C28	B2C1	B2C2

A1	8.7627 bABC	8.3126 aQ	8.0901 a
A2	9.0567 aBCDEFGHI	8.1753 b	7.8869 b
A3	9.0521 aBCDE	8.3583 aLMNOPQ	7.8869 b

Continuação

Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

BxC			
A	B2C3	B2C4	B2C5

A1	7.8945 a	8.6010 a	ABCDEF GHIJL 8.2148 b
A2	7.8869 a	8.4292 b	8.3456 a
A3	7.8869 a	8.4013 b	JLMNOPQ 8.2615 abPQ

Continuação  
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

BxC			
A			
	B2C6	B2C7	B2C8

A1	7.8935 a	7.8915 a	8.5970 a	ABCDEF GHIJL
A2	7.8894 a	7.8904 a	8.4875 a	
A3	7.8960 a	7.8874 a	8.3654 b	LMNOPQ

Continuação  
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

BxC			
A			
	B2C9	B2C10	B2C11

A1	8.5321 a	FGHIJLMNOP 8.3638 b	MNOPQ 8.3395 b	OPQ
A2	8.4013 b	8.4916 a	8.5235 a	
A3	8.2746 c	PQ 8.3329 b	MNOPQ 8.3425 b	MNOPQ

Continuação  
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

BxC			
A			
	B2C12	B2C13	B2C14

A1	8.2863 b	8.1829 a	8.1018 ab
A2	8.4404 a	8.2153 a	8.1778 a
A3	8.3238 b	MNOPQ 8.1221 a	8.0607 b

Continuação  
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

BxC			
A			
	B2C15	B2C16	B2C17

A1	7.9036 a	8.4018 bLMNOPQ	8.0780 b
A2	7.9001 a	8.8529 aIJLMNO	8.3882 a
A3	7.9102 a	8.9208 aDEF	8.4647 aHIJLMNOP

Continuação  
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

BxC			
A			
	B2C18	B2C19	B2C20

A1	8.5422 b	EF GHIJLMNO 8.4728 b	HIJLMNOPQ 8.6066 b	ABCDEF GHIJL
A2	9.0810 a	BCDEFGH 9.0126 a	CDEFGHIJ 8.9847 a	DEFGHIJL
A3	9.0501 a	BCDE 9.0709 a	ABCDE 8.9685 a	CDEF

Continuação  
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

BxC			
A			
	B2C21	B2C22	B2C23

A1	8.3466	bNOPQ	8.0486	c	8.0471	b
A2	8.9680	aDEFGHIJLM	8.8783	aHIJLMNO	8.9340	aFGHIJLMNO
A3	9.0136	aBCDEF	8.2310	bQ	7.9219	c

Continuação  
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

BxC			
A			
	B2C24	B2C25	B2C26

A1	8.8017 a	A 8.4338 ab	JLMNOPQ 8.3664 b	MNOPQ
A2	8.7810 a	LMNO 8.5301 a	Q 8.9953 a	DEFGHIJ
A3	8.5514 b	HIJL 8.3349 b	MNOPQ 8.3476 b	LMNOPQ

Continuação  
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

BxC			
A			
	B2C27	B2C28	B3C1

A1	8.0278 b	8.7926 b	AB 8.3507 b	MNOPQ
A2	8.4728 a	9.1403 a	ABCDEF 8.2189 c	
A3	8.0283 b	9.0937 a	ABCD 8.6390 a	GH

Continuação  
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

BxC

A			
	B3C2	B3C3	B3C4

A1	8.3061 b	8.1129 b	8.7637 bABC
A2	8.5078 a	8.3157 a	8.9751 aDEFGHIJLM
A3	8.2797 bPQ	8.1829 b	8.6132 cHI

Continuação  
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

	BxC		
A	B3C5	B3C6	B3C7

A1	8.6618 bABCDEF GHI	8.1961 b	7.9315 b
A2	8.9224 aGHIJLMNO	8.3973 a	8.3055 a
A3	8.5184 cHIJLMN	8.3532 aLMNOPQ	8.2462 aQ

Continuação  
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

	BxC		
A	B3C8	B3C9	B3C10

A1	8.7024 cABCDEFG	8.5448 cEFGHIJLMNO	8.6791 bABCDEF GH
A2	9.0501 aBCDEFGHI	9.0146 aCDEFGHIJ	9.0202 aCDEFGHIJ
A3	8.9300 bDEF	8.8823 bEF	9.0060 aCDEF

Continuação  
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

	BxC		
A	B3C11	B3C12	B3C13

A1	8.5985 bABCDEF GHIJL	8.5498 bDEFGHIJLMN	8.4667 bIJLMNOPQ
A2	9.0202 aCDEFGHIJ	8.9918 aDEFGHIJ	8.9791 aDEFGHIJLM
A3	8.9589 aDEF	8.9482 aDEF	8.9360 aDEF

Continuação  
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

	BxC		
A	B3C14	B3C15	B3C16

A1	8.0724 a	7.9254 a	8.4368 bIJLMNOPQ
A2	8.1033 a	8.0288 a	9.0982 aABCDEFG

A3	8.0243 a	7.9462 a	9.0911 aABCD
----	----------	----------	--------------

Continuação  
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

	BxC		
A	B3C17	B3C18	B3C19

A1	8.0957 b	8.7571 bABCD	8.6624 bABCDEF GHI
A2	8.5645 aPQ	9.2320 aAB	9.2133 aABC
A3	8.6056 aHIJ	9.2184 aAB	9.1753 aABC

Continuação  
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

	BxC		
A	B3C20	B3C21	B3C22

A1	8.6411 bABCDEF GHIJ	8.4378 bIJLMNOPQ	8.1008 c
A2	9.2133 aABC	9.1763 aABCD	9.0663 aBCDEF GH
A3	9.2168 aAB	9.1068 aABCD	8.5321 bHIJLM

Continuação  
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

	BxC		
A	B3C23	B3C24	B3C25

A1	8.0815 b	8.7206 bABCDEF	8.5204 bFGHIJLMNOPQ
A2	9.0668 aBCDEF GH	9.1074 aABCDEF G	9.0780 aBCDEF GH
A3	7.9153 c	9.0658 aABCDE	9.0658 aABCDE

Continuação  
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)

	BxC		
A	B3C26	B3C27	B3C28

A1	8.5884 bBCDEF GHIJL	8.0972 b	8.7450 bABCDE
A2	9.1540 aABCDE	8.7455 aNOP	9.2903 aA
A3	8.6385 bGH	8.0982 b	9.2680 aA

dms para colunas = 0.1154 dms para linhas = 0.2085

Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)				
AxB	C			
	C1	C2	C3	C4
A1B1	8.3040 bcdEF	8.0521 cGHI	7.8894 cl	8.5321 cdBC
A1B2	8.3126 bcDEFG	8.0901 cHI	7.8945 cL	8.6010 cB
A1B3	8.3507 bFGH	8.3061 bGH	8.1129 bIJ	8.7637 bA
A2B1	8.1581 dG	7.8869 dH	7.8869 cH	8.4034 deD
A2B2	8.1753 cdH	7.8869 dI	7.8869 cl	8.4292 deEF
A2B3	8.2189 bcdIJ	8.5078 aH	8.3157 al	8.9751 aDE
A3B1	8.3152 bcDE	7.8869 dI	7.8869 cl	8.3466 eCDE
A3B2	8.3583 BCD	7.8869 dH	7.8869 cH	8.4013 deBCD
A3B3	8.6390 aF	8.2797 bHI	8.1829 abHIJ	8.6132 bcF

Continuação Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)				
AxB	C			
	C5	C6	C7	C8
A1B1	8.1677 dFG	7.8894 cl	7.8869 bl	8.5427 cdBC
A1B2	8.2148 cdFGH	7.8935 cL	7.8915 bL	8.5970 bcB
A1B3	8.6618 bABC	8.1961 bHI	7.9315 bJL	8.7024 bABC
A2B1	8.3431 cDEF	7.8904 cH	7.8904 bH	8.4292 deD
A2B2	8.3456 cFGH	7.8894 cl	7.8904 bl	8.4875 cdeEF
A2B3	8.9224 aEF	8.3973 aHI	8.3055 al	9.0501 aBCDE
A3B1	8.2569 cdDEF	7.8915 cl	7.8970 bl	8.3517 eCDE
A3B2	8.2615 cdDE	7.8960 cH	7.8874 bH	8.3654 eCD
A3B3	8.5184 bFG	8.3532 aGH	8.2462 aHI	8.9300 aDE

Continuação Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)				
AxB	C			
	C9	C10	C11	C12
A1B1	8.5047 bcBCD	8.3334 dDEF	8.2888 dEF	8.2625 dEF
A1B2	8.5321 bBC	8.3638 cdCDEFG	8.3395 cdDEFG	8.2863 dEFG
A1B3	8.5448 bBCDE	8.6791 bABC	8.5985 bABCDE	8.5498 bBCDE
A2B1	8.3704 cdeD	8.4556 cdD	8.4763 bcD	8.4018 bcdD
A2B2	8.4013 bcdEF	8.4916 cEF	8.5235 bEF	8.4404 bcEF
A2B3	9.0146 aCDE	9.0202 aCDE	9.0202 aCDE	8.9918 aDE
A3B1	8.2245 eEFG	8.3040 dDE	8.3086 dDE	8.2984 cdDE
A3B2	8.2746 deDE	8.3329 dCD	8.3425 cdCD	8.3238 cdCD
A3B3	8.8823 aE	9.0060 aCDE	8.9589 aDE	8.9482 aDE

Continuação Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)				
AxB	C			
	C13	C14	C15	C16
A1B1	8.1570 cFG	8.0734 abGH	7.8986 aHI	8.3679 cCDE
A1B2	8.1829 cGHI	8.1018 abHI	7.9036 aJL	8.4018 cCDE
A1B3	8.4667 bDEFG	8.0724 abIJL	7.9254 aL	8.4368 cEFG
A2B1	8.1854 cEFG	8.1611 abFG	7.8904 aH	8.8119 bBC
A2B2	8.2153 cGH	8.1778 aH	7.9001 al	8.8529 bCD
A2B3	8.9791 aDE	8.1033 abJL	8.0288 aL	9.0982 aBCDE
A3B1	8.1053 cFGH	8.0501 abGHI	7.8986 al	8.8387 bB
A3B2	8.1221 cEFG	8.0607 abFGH	7.9102 aH	8.9208 bA
A3B3	8.9360 aDE	8.0243 bJLM	7.9462 aLM	9.0911 aABCD

Continuação Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)				
AxB	C			
	C17	C18	C19	C20
A1B1	8.0602 dGHI	8.4414 dBCDE	8.4409 dBCDE	8.5579 cB
A1B2	8.0780 dHIJ	8.5422 dBC	8.4728 dBCD	8.6066 cB
A1B3	8.0957 dIJL	8.7571 cA	8.6624 aBC	8.6411 cABCD
A2B1	8.3542 cDE	9.0202 bA	8.9462 bAB	8.9492 bAB
A2B2	8.3882 cEFG	9.0810 abAB	9.0126 bABC	8.9847 bABC
A2B3	8.5645 abGH	9.2320 aAB	9.2133 aAB	9.2133 aAB
A3B1	8.4216 bcCD	9.0116 bAB	8.9862 bAB	8.9416 bAB
A3B2	8.4647 abcBC	9.0501 bA	9.0709 abA	8.9685 bA
A3B3	8.6056 aF	9.2184 aAB	9.1753 aABC	9.2168 aAB

Continuação Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)				
AxB	C			
	C21	C22	C23	C24
A1B1	8.3390 dDEF	8.0156 eGHI	7.9959 cdGHI	8.7581 bA
A1B2	8.3466 dEFG	8.0486 eHIJL	8.0471 cdHIJL	8.8017 bA
A1B3	8.4378 dEFG	8.1008 deIJL	8.0815 cIJL	8.7206 bAB
A2B1	8.9244 cAB	8.8266 bBC	8.7728 bBC	8.7364 bC
A2B2	8.9680 bcABC	8.8783 bCD	8.9340 aBCD	8.7810 bD
A2B3	9.1763 aABC	9.0663 aBCDE	9.0668 aBCDE	9.1074 aBCD
A3B1	8.9117 cAB	8.2062 dEFG	7.9148 dI	8.5154 cC
A3B2	9.0136 bcA	8.2310 dDEF	7.9219 dH	8.5514 cB
A3B3	9.1068 abABCD	8.5321 cFG	7.9153 dM	9.0658 aBCD

Continuação				
Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)				
-----				
C				
AxB	-----			
	C25	C26	C27	C28
-----				
A1B1	8.4089 bcBCDE	8.3045 dEF	8.0004 cGHI	8.7627 cA
A1B2	8.4338 bcBCDE	8.3664 dCDEF	8.0278 cIJL	8.7926 cA
A1B3	8.5204 bcDEF	8.5884 cABCDE	8.0972 cIJL	8.7450 cA
A2B1	8.5017 bD	8.9274 baB	8.4470 bD	9.0567 ba
A2B2	8.5301 bE	8.9953 baBC	8.4728 bEF	9.1403 abA
A2B3	9.0780 aBCDE	9.1540 aABCD	8.7455 aFG	9.2903 aA
A3B1	8.3238 cDE	8.2979 dDE	8.0009 cHI	9.0521 bA
A3B2	8.3349 cCD	8.3476 dCD	8.0283 cGH	9.0937 ba
A3B3	9.0658 aBCD	8.6385 cF	8.0982 cIJL	9.2680 aA
-----				
dms para colunas =	0.1528	dms para linhas =	0.1829	
Classific.c/letras minúsculas	Classific.c/letras maiúsculas			

Fator 1 x Fator 2 x Fator 3 (AxBxC)			
-----			
B			
AxC	-----		
	B1	B2	B3
-----			
A1C1	8.3040 A	8.1581 B	8.3152 nopqA
A1C2	8.0521 A	7.8869 B	7.8869 B
A1C3	7.8894 A	7.8869 A	7.8869 A
A1C4	8.5321 fghijlmnopA	8.4034 B	8.3466 lmnopqB
A1C5	8.1677 B	8.3431 A	8.2569 pqAB
A1C6	7.8894 A	7.8904 A	7.8915 A
A1C7	7.8869 A	7.8904 A	7.8970 A
A1C8	8.5427 efghijlmnoA	8.4292 AB	8.3517 lmnopqB
A1C9	8.5047 ghijlmnopqA	8.3704 B	8.2245 qC
A1C10	8.3334 pqB	8.4556 A	8.3040 pqB
A1C11	8.2888 B	8.4763 A	8.3086 opqB
A1C12	8.2625 B	8.4018 A	8.2984 pqAB
A1C13	8.1570 A	8.1854 A	8.1053 A
A1C14	8.0734 A	8.1611 A	8.0501 A
A1C15	7.8986 A	7.8904 A	7.8986 A
A1C16	8.3679 mnopqB	8.8119 jlmnoA	8.8387 fgA
A1C17	8.0602 B	8.3542 A	8.4216 ijlmnopqA
A1C18	8.4414 jlmnopqB	9.0202 cdefghijA	9.0116 bcdefA
A1C19	8.4409 jlmnopqB	8.9462 efghijlmnA	8.9862 cdefA
A1C20	8.5579 cdefghijlmB	8.9492 efghijlmnA	8.9416 defA
A1C21	8.3390 opqB	8.9244 ghijlmnoA	8.9117 defA
A1C22	8.0156 C	8.8266 jlmnoA	8.2062 B
A1C23	7.9959 B	8.7728 mnopA	7.9148 B
A1C24	8.7581 abcdA	8.7364 opqA	8.5154 hijlmnoB
A1C25	8.4089 lmnopqAB	8.5017 A	8.3238 mnopqB
A1C26	8.3045 B	8.9274 ghijlmnoA	8.2979 pqB

A1C27	8.0004 B	8.4470 A	8.0009 B
A1C28	8.7627 abcB	9.0567 bcdefghia	9.0521 bcdeA
A2C1	8.3126 qA	8.1753 B	8.3583 lmnopqA
A2C2	8.0901 A	7.8869 B	7.8869 B
A2C3	7.8945 A	7.8869 A	7.8869 A
A2C4	8.6010 abcdefghijlA	8.4292 B	8.4013 jlmnopqB
A2C5	8.2148 B	8.3456 A	8.2615 pqAB
A2C6	7.8935 A	7.8894 A	7.8960 A
A2C7	7.8915 A	7.8904 A	7.8874 A
A2C8	8.5970 abcdefghijlA	8.4875 A	8.3654 lmnopqB
A2C9	8.5321 fghijlmnopA	8.4013 B	8.2746 pqC
A2C10	8.3638 mnopqB	8.4916 A	8.3329 mnopqB
A2C11	8.3395 opqB	8.5235 A	8.3425 mnopqB
A2C12	8.2863 B	8.4404 A	8.3238 mnopqB
A2C13	8.1829 A	8.2153 A	8.1221 A
A2C14	8.1018 AB	8.1778 A	8.0607 B
A2C15	7.9036 A	7.9001 A	7.9102 A
A2C16	8.4018 lmnopqB	8.8529 ijlmnoA	8.9208 defA
A2C17	8.0780 B	8.3882 A	8.4647 hijlmnopA
A2C18	8.5422 efghijlmnoB	9.0810 bcdefghA	9.0501 bcdeA
A2C19	8.4728 hijlmnopqB	9.0126 cdefghijA	9.0709 abcdeA
A2C20	8.6066 abcdefghijlB	8.9847 defghijlA	8.9685 cdefA
A2C21	8.3466 nopqB	8.9680 defghijlmA	9.0136 bcdefA
A2C22	8.0486 C	8.8783 hijlmnoA	8.2310 qB
A2C23	8.0471 B	8.9340 fghijlmnoA	7.9219 C
A2C24	8.8017 aA	8.7810 lmnoA	8.5514 hijlB
A2C25	8.4338 jlmnopqAB	8.5301 qA	8.3349 mnopqB
A2C26	8.3664 mnopqB	8.9953 defghijA	8.3476 lmnopqB
A2C27	8.0278 B	8.4728 A	8.0283 B
A2C28	8.7926 abB	9.1403 abcdefA	9.0937 abcdA
A3C1	8.3507 mnopqB	8.2189 C	8.6390 ghA
A3C2	8.3061 B	8.5078 A	8.2797 pqB
A3C3	8.1129 B	8.3157 A	8.1829 B
A3C4	8.7637 abcB	8.9751 defghijlmA	8.6132 hiC
A3C5	8.6618 abcdefghib	8.9224 ghijlmnoA	8.5184 hijlmnC
A3C6	8.1961 B	8.3973 A	8.3532 lmnopqA
A3C7	7.9315 B	8.3055 A	8.2462 qA
A3C8	8.7024 abcdefgC	9.0501 bcdefghia	8.9300 defB
A3C9	8.5448 efghijlmnoC	9.0146 cdefghijA	8.8823 efB
A3C10	8.6791 abcdefghB	9.0202 cdefghijA	9.0060 cdefA
A3C11	8.5985 abcdefghijlB	9.0202 cdefghijA	8.9589 defA
A3C12	8.5498 defghijlmnB	8.9918 defghijA	8.9482 defA
A3C13	8.4667 ijlmnopqB	8.9791 defghijlmA	8.9360 defA
A3C14	8.0724 A	8.1033 A	8.0243 A
A3C15	7.9254 A	8.0288 A	7.9462 A
A3C16	8.4368 jlmnopqB	9.0982 abcdefgA	9.0911 abcdA
A3C17	8.0957 B	8.5645 pqA	8.6056 hijA
A3C18	8.7571 abcdB	9.2320 abA	9.2184 abA
A3C19	8.6624 abcdefghib	9.2133 abcA	9.1753 abcA
A3C20	8.6411 abcdefghijB	9.2133 abcA	9.2168 abA
A3C21	8.4378 jlmnopqB	9.1763 abcdA	9.1068 abcdA
A3C22	8.1008 C	9.0663 bcdefghA	8.5321 hijlmB
A3C23	8.0815 B	9.0668 bcdefghA	7.9153 C

A3C24 8.7206 abcdefB 9.1074 abcdefgA 9.0658 abcdeA  
 A3C25 8.5204 fghijlmnopqB 9.0780 bcdefghA 9.0658 abcdeA  
 A3C26 8.5884 bcdefghijlB 9.1540 abcdeA 8.6385 ghB  
 A3C27 8.0972 B 8.7455 nopA 8.0982 B  
 A3C28 8.7450 abcdeB 9.2903 aA 9.2680 aA

dms para colunas = 0.2085 dms para linhas = 0.1154

Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

As médias seguidas pela mesma letra não diferem  
 estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste  
 de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

MG = 8.46623 CV% = 0.71

Ponto médio = 8.59469

DADOS

8.270066 8.286792 8.355214  
 7.956843 8.105852 8.093688  
 7.886900 7.886900 7.894503  
 8.590892 8.542235 8.463169  
 8.198603 8.145385 8.159069  
 7.886900 7.886900 7.894503  
 7.886900 7.886900 7.886900  
 8.562002 8.572645 8.493580  
 8.475333 8.502703 8.536154  
 8.347611 8.276148 8.376501  
 8.323283 8.283751 8.259422  
 8.279189 8.292873 8.215328  
 8.175795 8.113455 8.181877  
 8.080004 8.086085 8.054155  
 7.899064 7.909708 7.886900  
 8.338489 8.359776 8.405391  
 8.055676 8.086085 8.038950  
 8.473813 8.490539 8.359776  
 8.449485 8.422116 8.451006  
 8.598494 8.549838 8.525510  
 8.338489 8.324804 8.353694  
 8.034389 7.967486 8.045032  
 7.996376 8.016143 7.975089  
 8.771831 8.755106 8.747503  
 8.414514 8.393227 8.419075  
 8.308079 8.271586 8.333927  
 7.996376 8.017663 7.987253  
 8.761188 8.741421 8.785516  
 8.267025 8.308079 8.362817  
 8.213807 8.156029 7.900585  
 7.886900 7.892982 7.903625  
 8.476854 8.701888 8.624343  
 8.029827 8.271586 8.343050  
 7.894503 7.899064 7.886900  
 7.886900 7.886900 7.900585

8.586330 8.589371 8.615219  
 8.604576 8.560481 8.431239  
 8.343050 8.367378 8.381063  
 8.306558 8.388665 8.323283  
 8.314160 8.236615 8.308079  
 8.180356 8.192520 8.175795  
 8.058717 8.086085 8.160590  
 7.886900 7.920351 7.903625  
 8.340009 8.414514 8.451006  
 8.108893 7.999417 8.125619  
 8.575686 8.587851 8.463169  
 8.422116 8.438842 8.557441  
 8.709491 8.612179 8.498141  
 8.390185 8.335447 8.314160  
 8.007019 8.089127 8.049594  
 8.003979 8.028307 8.108893  
 8.837213 8.809843 8.758146  
 8.457088 8.438842 8.405391  
 8.441882 8.311119 8.346091  
 8.049594 8.007019 8.026786  
 8.791597 8.783995 8.802241  
 8.312640 8.388665 8.350653  
 8.236615 8.232054 8.449485  
 8.084565 8.114975 8.139303  
 8.875225 8.768790 8.647150  
 8.677560 8.612179 8.695806  
 8.308079 8.160590 8.119536  
 7.943159 7.949241 7.902105  
 8.586330 8.718614 8.802241  
 8.555920 8.628904 8.449485  
 8.692765 8.741421 8.603056  
 8.587851 8.571125 8.636506  
 8.522469 8.549838 8.577207  
 8.469252 8.435801 8.495100  
 8.058717 8.119536 8.038950  
 7.891461 7.956843 7.927954  
 8.384104 8.493580 8.432759  
 8.119536 8.032868 8.134742  
 8.666917 8.796159 8.808323  
 8.753585 8.586330 8.647150  
 8.872184 8.519428 8.531592  
 8.405391 8.429719 8.478374  
 8.086085 8.134742 8.081524  
 8.093688 8.095208 8.055676  
 8.787036 8.660834 8.714052  
 8.495100 8.499661 8.566564  
 8.615219 8.554399 8.595453  
 8.267025 8.060237 7.964446  
 8.768790 8.718614 8.747503  
 8.095208 8.232054 8.146906  
 7.886900 7.886900 7.886900  
 7.886900 7.886900 7.886900  
 8.355214 8.463169 8.391706



8.338489	8.368898	8.321763	8.498141	8.590892	8.434280
7.886900	7.889941	7.894503	8.343050	8.346091	8.257902
7.894503	7.889941	7.886900	8.955812	8.972537	8.996865
8.490539	8.391706	8.405391	8.910196	8.987742	8.869143
8.382583	8.400829	8.327845	8.417555	8.376501	8.397788
8.460129	8.432759	8.473813	8.270066	8.236615	8.409952
8.472293	8.507264	8.449485	9.002947	9.088095	9.059205
8.361296	8.457088	8.387144	9.022714	8.963414	9.057685
8.201644	8.163631	8.191000	9.012070	8.967976	9.080493
8.145385	8.154508	8.183397	8.972537	9.027275	9.060726
7.889941	7.886900	7.894503	8.960373	9.042480	8.972537
8.823528	8.812884	8.799200	8.957332	9.012070	8.967976
8.358255	8.338489	8.365857	8.156029	8.045032	8.108893
9.013591	9.037918	9.009029	8.008540	8.040470	8.037430
8.971017	8.951250	8.916279	9.139792	9.060726	9.094177
8.966455	8.933004	8.948209	8.545277	8.530071	8.618260
8.896512	8.967976	8.908676	9.255350	9.237104	9.203653
8.794639	8.847856	8.837213	9.224940	9.203653	9.211255
8.776393	8.785516	8.756626	9.224940	9.206694	9.208215
8.730778	8.739901	8.738380	9.194530	9.186928	9.147394
8.505743	8.487497	8.511826	9.088095	9.051603	9.059205
8.946689	8.907155	8.928443	9.092656	9.054644	9.053123
8.475333	8.452526	8.412993	9.165641	9.068329	9.088095
9.080493	9.060726	9.028795	9.044001	9.071369	9.118505
8.175795	8.238135	8.111934	9.240145	9.088095	9.133710
7.886900	7.886900	7.886900	8.768790	8.875225	8.592412
7.886900	7.886900	7.886900	9.275117	9.302485	9.293363
8.492059	8.449485	8.346091	8.338489	8.239656	8.367378
8.405391	8.187959	8.443403	7.886900	7.886900	7.886900
7.886900	7.886900	7.894503	7.886900	7.886900	7.886900
7.894503	7.886900	7.889941	8.291353	8.341530	8.406911
8.463169	8.417555	8.581768	8.265505	8.298956	8.206205
8.472293	8.355214	8.376501	7.886900	7.889941	7.897543
8.492059	8.514867	8.467731	7.894503	7.896023	7.900585
8.587851	8.531592	8.451006	8.340009	8.346091	8.368898
8.416034	8.469252	8.435801	8.274628	8.236615	8.162110
8.256381	8.154508	8.235094	8.298956	8.267025	8.346091
8.181877	8.162110	8.189480	8.335447	8.282230	8.308079
7.911228	7.886900	7.902105	8.327845	8.305037	8.262464
8.869143	8.802241	8.887389	8.113455	8.084565	8.118016
8.298956	8.408431	8.457088	8.040470	8.072401	8.037430
9.074410	9.015111	9.153477	7.906666	7.886900	7.902105
8.999906	8.963414	9.074410	8.847856	8.869143	8.799200
8.990783	9.013591	8.949730	8.443403	8.419075	8.402349
8.999906	8.990783	8.913238	9.016631	9.012070	9.005988
8.864581	8.815926	8.954291	8.960373	9.018152	8.980140
8.891951	9.021193	8.888909	8.960373	8.951250	8.913238
8.727736	8.785516	8.829610	8.940606	8.911717	8.882828
8.542235	8.537674	8.510305	8.207726	8.187959	8.222931
9.060726	9.015111	8.910196	7.894503	7.912748	7.937077
8.560481	8.492059	8.365857	8.516387	8.536154	8.493580
9.179325	9.153477	9.088095	8.330886	8.346091	8.294394
8.245738	8.294394	8.116495	8.308079	8.315681	8.270066

8.000937	7.976610	8.025266	8.663876	8.612179	8.641068
9.066808	9.048562	9.040959	8.341530	8.206205	8.291353
8.451006	8.368898	8.254861	8.160590	8.181877	8.206205
7.886900	7.886900	7.886900	8.761188	8.601535	8.476854
7.886900	7.886900	7.886900	8.627383	8.435801	8.492059
8.409952	8.454046	8.340009	8.338489	8.285271	8.435801
8.323283	8.187959	8.273107	8.216848	8.175795	8.346091
7.903625	7.897543	7.886900	8.920840	8.864581	9.004468
7.888421	7.886900	7.886900	8.856979	8.951250	8.838733
8.355214	8.330886	8.409952	8.984701	8.974057	9.059205
8.329366	8.333927	8.160590	8.951250	8.967976	8.957332
8.308079	8.346091	8.344570	8.925402	8.937566	8.981660
8.368898	8.314160	8.344570	8.954291	8.948209	8.905635
8.368898	8.282230	8.320243	8.016143	8.054155	8.002458
8.110414	8.114975	8.140823	7.973568	7.937077	7.927954
8.052634	8.058717	8.070881	9.077452	9.050082	9.145874
7.927954	7.903625	7.899064	8.522469	8.647150	8.647150
8.983180	8.916279	8.863061	9.202132	9.215817	9.237104
8.437321	8.399308	8.557441	9.153477	9.179325	9.193009
9.135230	9.015111	8.999906	9.194530	9.215817	9.240145
9.037918	9.059205	9.115464	9.088095	9.129148	9.103300
9.034878	8.955812	8.914758	8.384104	8.198603	9.013591
9.018152	9.077452	8.945168	7.934035	7.902105	7.909708
8.300476	8.253341	8.139303	9.107862	9.034878	9.054644
7.902105	7.914269	7.949241	9.053123	9.106341	9.037918
8.562002	8.540715	8.551358	8.642589	8.610658	8.662355
8.353694	8.344570	8.306558	8.160590	8.171233	7.962925
8.412993	8.333927	8.295915	9.258391	9.267514	9.278157
8.037430	8.078483	7.969007	-----		
9.103300	9.120026	9.057685			

**ANEXO A**

Pedido de Patente nº BR 10 2013 026485 7 depositado em 14/10/2013,  
Depositante Centrais Elétricas do Norte do Brasil SA – Eletrobrás/Eletronorte